MICROBIOLOGIA BÁSICA

AUTOR

CAMILO DEL CISTIA

MICROBIOLOGIA BÁSICA

AUTOR
CAMILO DEL CISTIA

1ª EDIÇÃO
SESES
RIO DE JANEIRO 2015

Sumário

1

Evolução da Microbiologia

OBJETIVOS

- Reconhecer a importância da descoberta do microscópio para a Microbiologia.
- Diferenciar a abiogênese da biogênese.
- Identificar a importância de Louis Pasteur para a abiogênese.
- Identificar o início da Microbiologia e a sua importância para a nossa vida.
- Identificar a célula como unidade comum a todos os seres vivos, bem como sua estrutura.
- Reconhecer os reinos Monera, Protista, Plantae, Animalia e Fungi.
- Identificar as características dos reinos Monera, Protista, Plantae, Animalia e Fungi.
- Identificar as características das bactérias com relação ao tamanho, a morfologia e as estruturas da sua célula.
- Identificar e listar as características das células dos fungos.
- Diferenciar os fungos unicelulares dos multicelulares.
- Compreender a diferença entre um fungo perfeito e um fungo imperfeito.
- Identificar os fungos quanto a sua forma de vida e como eles obtêm alimentos.
- Listar as características e estruturas morfológicas dos fungos.

1.1 História da evolução da Microbiologia

Para compreender o atual estágio da Microbiologia, precisamos conhecer como ela chegou até onde estamos atualmente. Os primeiros cientistas que optaram por estudar Microbiologia foram motivados, no decorrer de suas descobertas, por competição, inspiração e sorte. Houve conceitos errôneos que levaram a verdade e verdades que não foram inicialmente reconhecidas.

1.1.1 As primeiras observações

Robert Hooke (figura 1.1): o Inglês Robert Hooke descreveu em 1665, a estrutura celular da cortiça e publicou Micrographia, sobre suas descobertas em ótica e iniciando suas análises dos efeitos do prisma, esferas e lâminas, com a utilização do microscópio. Com o microscópio também deu importante contribuição ao estudo da estrutura das células, devendo-se a ele a origem deste termo. Hooke foi capaz de visualizar as células individualmente. A descoberta de Hooke marcou o início da teoria celular - todos os seres vivos são compostos de células. Investigações posteriores sobre a estrutura e funcionamento das células teve esta teoria como base.

Figura 1.1 – Robert Hooke (1635-1703)

Anton van Leeuwenhoek (figura 1.2): o holandês Leeuwenhoek foi, provavelmente, o primeiro a realmente observar os microrganismos vivos através de lentes de aumento. Entre 1673 e 1723, ele escreveu uma série de cartas (mais de 300) à Sociedade Real Inglesa descrevendo o que ele chamou de "animálculos" que ele via através de seu modesto microscópio de uma única lente. Os desenhos detalhados sobre os "animálculos" de águas de rios, saliva, fezes, líquido no qual grãos de

Figura 1.2 – Anton-van-Leeuwenhoek (1673-1723)

pimenta forma submersos e no material removido de seus dentes, foram identificados com representações de bactérias e protozoários. Essas cartas alertaram o mundo para a existência de formas microscópicas de vida e originaram a microbiologia.

Edward Jenner (figura 1.3) contribuiu de forma revolucionária para a Medicina com o desenvolvimento inicial da vacinação. Conta-se que uma senhora que trabalhava em uma fazenda ordenhando vacas chamada, Sarah Nelmes gabava-se que não pegava varíola (doença muito disseminada na Europa na época) porque já tinha contraído antes a menos séria varíola bovina das vacas que ela ordenhava. Um surto de varíola em 1788 provou que ela estava certa. Todos os pacientes de Jenner que já tinham tido varíola bovina não contraíram varíola. No ano de 1796, Jenner provou sua teoria infectando um garoto primeiro com varíola bovina e depois com varíola. Ele descobriu que o garoto estava imune à doença. Jenner chamou seu tratamento de vacinação (palavra derivada da palavra latina para varíola bovina - vaccina).

Figura 1.3 – Edward Jenner

Os cientistas britânicos Edward Jenner e Alexander Fleming realizaram descobertas revolucionárias no campo da Medicina e Fisiologia, marcando o início de uma revolução na área médica e biológica.

Louis Pasteur (figura 1.4) era um químico francês bastante respeitado na época por seus inúmeros trabalhos científico, dedicou seus consideráveis talentos ao estudo dos microrganismos. Interessou-se pela indústria de vinhos franceses e pela função dos microrganismos na produção de álcool. Este interesse incentivou-o a continuar o debate sobre a origem dos microrganismos, uma vez que ainda persistia alguns defensores da geração espontânea ou abiogênese, a exemplo do naturalista francês Félix Archiméde Pouchet (1800 - 1872). Pasteur fez uma

Figura 1.4 – Louis Pasteur (1822 - 1895)

série de experimentos definitivos. Um dos principais processos foi o uso de frascos de colo longo e curvado, semelhante ao pescoço de cisnes, que foram preenchidos com caldo nutritivo e aquecidos. O ar podia passar livremente através dos frascos abertos, mas nenhum microrganismo surgiu na solução. A poeira e os microrganismos depositavam-se na área sinuosa em forma de V do tubo e, portanto, não atingiam o caldo. Seus resultados foram comunicados com entusiasmo na Universidade de Sorbonna, em Paris, em 7 de abril de 1864. Pasteur deu um grande impulso na tecnologia de alimentos. O processo de preservação dos alimentos pela pasteurização foi criado por esse ilustre cientista, e o nome do processo de pasteurização foi dado em sua homenagem. Você terá a oportunidade de saber como funciona a pasteurização na disciplina de Microbiologia dos alimentos.

Os argumentos sobre a geração espontânea continuaram até 1861, quando a questão foi resolvida pelo cientista francês Louis Pasteur.

Robert Koch (figura 1.5) – foi um dos fundadores da microbiologia, o alemão foi o primeiro a descobrir o agente do carbúnculo e o bacilo da tuberculose. O médico e cientista Robert Koch, um dos precursores da moderna bacteriologia, dedicou-se a pesquisas acerca das relações entre agentes bacterianos e a transmissão de doenças, bem como ao estudo da higiene e de epidemias. Suas teses não aumentaram a expectativa de vida e melhoraram a saúde da população apenas na Alemanha, mas continuam, até hoje, sendo consideradas verdadeiros fundamentos da microbiologia moderna. Durante a Guerra Franco-Prussiana, de 1870 a 1871, Koch trabalhou como cirurgião. Após seu regresso ao país, assumiu a função de médico oficial da cidade na antiga província alemã de Posen (Poznan). Ali começou a estudar a biologia das bactérias. Naquela época, não havia ainda microscópios eletrônicos e, desta forma, as bactérias eram os menores agentes que podiam ser examinados através do microscópio. Koch descobriu o agente bacteriano causador do carbúnculo e descreveu, pela primeira vez, como a transmissão da doença se dá através dos esporos – este foi seu primeiro grande trabalho científico, publicado em 1876. Mais tarde, Koch foi chamado a Berlim para assumir a direção de

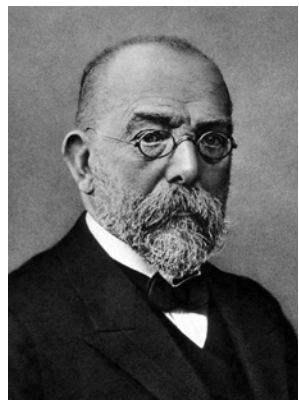



Figura 1.5 – Robert Koch

um laboratório bacteriológico recém-criado, onde conseguiu detectar o agente causador da tuberculose. Com a etiologia da Tuberculose, Koch conseguiu, pela primeira vez na história, identificar um microrganismo patogênico. Por este trabalho sobre a bactéria da tuberculose, ele recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1905.

(http://www.sbmicrobiologia.org.br/PDF/Koch.pdf).

© WIKIMEDIA

Figura 1.6 – Joseph Lister

Joseph Lister (figura 1.6) considerado pai da cirurgia moderna, pois foi o primeiro a utilizar uma solução de fenol como um eficiente agente antisséptico – substâncias que destroem ou impedem o crescimento de microrganismos em tecido vivo- isso reduziu o número de mortes por infecções pós-operatórias. Lister comunicou os métodos para esterilização de bandagens, compressas cirúrgicas, instrumental cirúrgico e assepsia de feridas. Com isso ele introduziu a cirurgia asséptica. Antes da descoberta, pelo médico inglês Joseph Lister, em 1865, que o fenol podia ser usado para esterilizar os instrumentos cirúrgicos, campo operatório e mãos dos cirurgiões, os hospitais eram campos de massacres, onde, a maioria dos pacientes que não morriam do trauma cirúrgico perecia de infecções. Juntamente com a anestesia e os antibióticos, a antissepsia foi responsável pelo grande avanço da cirurgia como método científico de tratamento de inúmeras doenças, ao longo do século XX (http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/people/josephlister.aspx).

Sir Alexander Fleming (figura 1.7) nasceu em 1881 na Escócia, formando-se em Bacteriologia. Fleming trabalhou no St. Mary's Hospital, em Londres, e serviu no Corpo Médico durante a Primeira Guerra Mundial. Ele se tornou interessado no problema de controlar infecções causadas por bactérias e continuou suas pesquisas depois da guerra. Fleming descobriu a penicilina, o primeiro antibiótico, o que marcou uma revolução na Medicina. Os Antibióticos são drogas que matam bactérias, eles, atualmente, são usados para o tratamento de doenças. Conta-se que, em uma manhã de 1928, Fleming estava preparando

sua rotineira amostra de culturas de bactérias quando notou que algo estava matando as bactérias. Ao investigar, descobriu que era um bolor de pão chamado penicilina. Dois outros excelentes cientistas, Howard Walter Florey (1898-1968) e Ernst Boris Chain (1906-1979), ajudaram a aperfeiçoar a manufatura de penicilina, e eles dividiram em 1945 o Prêmio Nobel de Medicina em com Fleming (http://www.biography.com/people/alexander-fleming-9296894#synopsis).

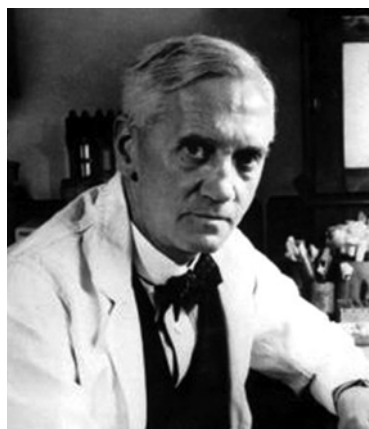



Figura 1.7 – Alexander Fleming

1.1.2 A importância da Microbiologia

A Microbiologia é uma ciência que foi impulsionada com a descoberta do microscópio por Leuwenhoek (1632 – 1723). A partir da descoberta do microscópio e a constatação da existência dos microrganismos, os cientistas começaram a indagar sua origem, surgindo então, as teorias da abiogênese ou geração espontânea e a biogênese. Após os experimentos de Lazzaro Spallanzani (1729 – 1799) que provaram que infusões quando aquecidas, esterilizadas e fechadas hermeticamente para evitar recontaminação impediam o aparecimento de microrganismos, a abiogênese foi descartada.

Acredita-se que os microrganismos (organismos pequenos só visíveis com o auxílio de lentes) apareceram na terra há bilhões de anos a partir de um material complexo de águas oceânicas ou de nuvens que circulavam a terra. Os microrganismos são antigos, porém a microbiologia como ciência é jovem, uma vez que os microrganismos foram evidenciados há 300 anos e só foram estudados e compreendidos 200 anos depois.

1.1.3 Quem descobriu os microrganismos?

Anton Van Leuwenhoek (1632 – 1723) era um homem comum que possuía um armazém, era zelador da prefeitura e servia como provador oficial de vinhos para a cidade de Delft na Holanda. Tinha como hobby polir lentes de vidro, as montava entre finas placas de bronze ou prata para inspecionar fibras e tecelagem de roupas, flores, folhas e pingos d'água. Na época, era comum o interesse

pelo mundo natural, mas Leuwenhoek tinha o cuidado de descrever, detalhadamente, tudo o que fazia e o que observava com suas lentes.

Usando seu precário microscópio, observava águas de rios, infusões de pimenta, saliva, fezes, etc.; até que verificou nesses materiais, a presença de um grande número de pequeníssimos objetos móveis e de formas diferentes, que não poderiam ser vistos sem a ajuda das lentes, e os chamou de “animáculos” por acreditar que seriam pequeninos animais vivos.

Leuwenhoek fez observações magníficas sobre a estrutura microscópica das sementes e embriões de vegetais, animais invertebrados, espermatozoides, sangue, circulação sanguínea etc. Uma dimensão inteiramente nova enriqueceu a biologia (bio = vida, logia = estudo). Todos os tipos principais de microrganismos que hoje conhecemos – protozoários, algas, fungos e bactérias foram primeiramente descritos por Leuwenhoek (Trabulsi, 1991).

1.1.4 O que é biogênese e abiogênese ou geração espontânea?

Após a revelação ao mundo da presença dos microrganismos, os cientistas começaram a indagar a origem desses seres e se dividiram em duas correntes de pensamento as quais veremos a seguir.

Biogênese – Alguns cientistas acreditavam inclusive Leuwenhoek, que as “sementes” destas criaturas microscópicas estão sempre presentes no ar, de onde ganham acesso aos materiais e ali crescem desde que as condições sejam adequadas ao seu desenvolvimento. A essa forma de multiplicação dos microrganismos chamou-se biogênese.

Abiogênese – Outros cientistas acreditavam que os microrganismos se formavam espontaneamente a partir da matéria orgânica em decomposição ou putrefação, essa forma de multiplicação chamou-se abiogênese.

CONEXÃO

A abiogênese também ficou conhecida como geração espontânea.

Video complementar

https://www.youtube.com/watch?v=EjyH5MkGdPY

A crença na geração espontânea de seres vivos teve uma longa existência. A ideia da geração espontânea teve origem na Grécia Antiga, que acreditava que rãs e minhocas surgiam, espontaneamente, de um pequeno lago ou lama. Outros acreditavam que larvas de insetos e moscas eram produzidas a partir de carne em decomposição. Pouco a pouco, essas ideias foram perdendo força, por demonstrações científicas como a do médico italiano Francesco Redi (1626 – 1697), que demonstrou que as larvas encontradas na carne em putrefação eram larvas de ovos de insetos e não um produto da geração espontânea.

Convencer os que apoiavam a abiogênese de que um ser não poderia surgir apenas da matéria orgânica, tornou-se bem mais difícil, principalmente, a partir do experimento de Heedham em 1749, que demonstrou que, de muitos tipos diferentes de infusões, invariavelmente, emergiam criaturas microscópicas (microrganismos), independentemente do tratamento que receberam protegidas ou não, fervidas ou não. Hoje, sabe-se que os experimentos de Heedham foram falhos, pois este não tomava precauções higiênicas para proteger seus experimentos do ar circundante, permitindo dessa forma a contaminação de suas infusões.

Cinquenta anos após os experimentos de Heedham, Spallanzani evidenciou em centenas de experiências, que o aquecimento das infusões até esterilização, pode impedir a contaminação por microrganismos. Posteriormente, Spallazani concluiu que poderá haver recontaminação das infusões por condução dos microrganismos pelo ar, desde que o frasco que a contenha não esteja hermeticamente fechado ou apresente rachadura, propiciando na infusão, o aparecimento de colônias de microrganismos.

A tarefa dos microrganismos na natureza é algo sensacional, especialmente, quando se lembra de seu papel como regulador do equilíbrio entre seres vivos e mortos.

1.2 Classificação dos microrganismos

Os seres vivos são constituídos de unidades microscópicas chamadas de células que formam, em conjunto, estruturas organizadas. As células são compostas de núcleo e citoplasma. Quando o núcleo celular é circundado por uma membrana nuclear ou carioteca, os organismos que as possuem são chamados

de eucarióticos, os que não possuem células com carioteca são os procarióticos a exemplo das bactérias.

Baseado na maneira pela qual os organismos obtêm alimentos, Robert H. Whittaker classificou os organismos vivos em 5 reinos: **reino Monera**, **reino Protista**, **reino Plantae**, **reino Animalia** e **reino Fungi**.

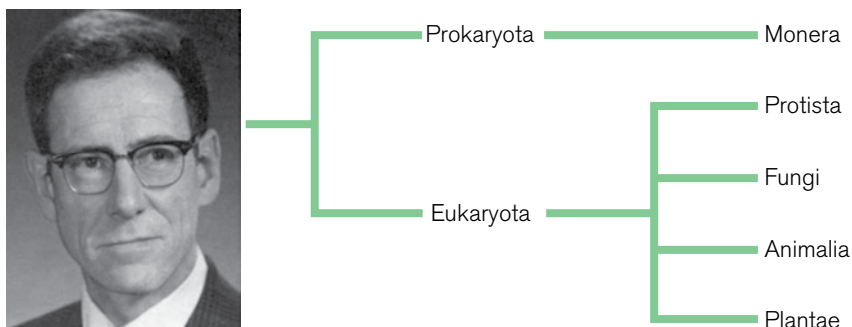



Figura 1.8 – Robert H. Whittaker. Fonte: https://earthlingnature.files.wordpress.com/2011/12/whittaker.jpg

Video complementar: https://www.youtube.com/watch?v=t63pCUzey3E

Os microrganismos pertencem a três dos cinco reinos: as bactérias são do reino Monera, os protozoários e algas microscópicas são Protistas e os fungos microscópicos como leveduras e bolores pertencem ao reino Fungi .

1.3 Célula

A célula é uma estrutura típica microscópica comum a todos os seres vivos. Com os avanços da microscopia eletrônica na década de 1940, foi possível a visualização de muitas estruturas da célula que seria impossível no microscópio ótico.

Todas as células se compõem de duas regiões internas principais conhecidas como núcleo e citoplasma. O núcleo, que é circundado pelo citoplasma, contém todas as informações genéticas do organismo, sendo responsável pela hereditariedade. O citoplasma é a sede primária dos processos de síntese e o centro das atividades funcionais em geral.

Em algumas células, o núcleo é circundado por uma membrana denominada de membrana nuclear ou carioteca. Compreende o grupo das eucarióticas, os protozoários, os fungos, a maior parte das algas. Estas células se assemelham as dos animais e plantas. Em contraste, as bactérias e o pequeno grupo de algas azul-verdes se caracterizam por células menores procarióticas por não apresentarem membrana nuclear.

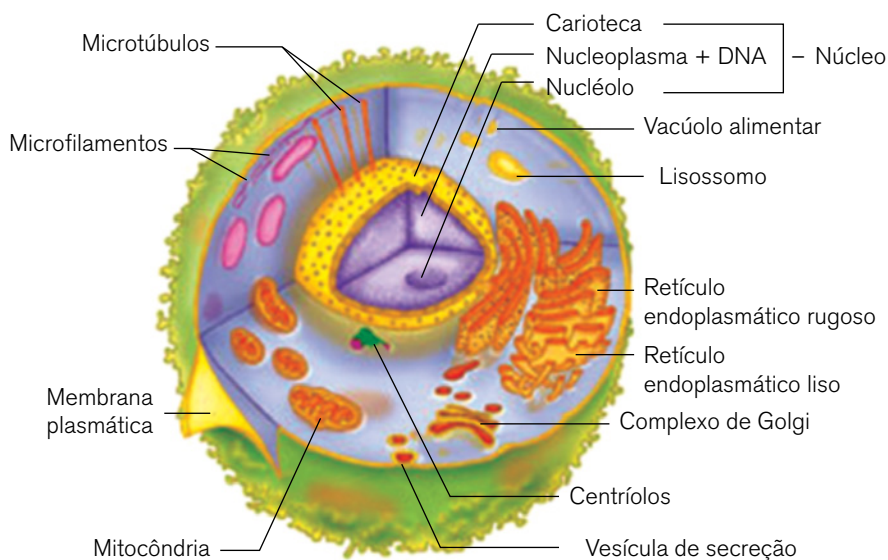



Figura 1.9 – Organização Celular. Fonte:http://www.vestibulandoweb.com.br/biologia/teoria/celula-eucarionte-1-2.jpg

Nas plantas e microrganismos, a parede celular é a única estrutura limitante. Seu único papel parece ser o de proteção contra injúrias mecânicas e impedem, principalmente, a ruptura osmótica quando a célula é colocada em ambiente com alto teor de água.

1.4 Classificação dos 5 reinos

A classificação dos organismos, mais recente, proposta por Robert H. Whittaker em 1969 foi baseada a partir da maneira pela qual o organismo obtém nutrientes de sua alimentação. Veja:

1. **Fotossíntese** – processo pelo qual a luz fornece energia para converter o dióxido de carbono em água e açúcares.
2. **Absorção** – a captação de nutrientes químicos dissolvidos em água.
3. **Ingestão** – entrada de partículas de alimentos não dissolvidas.

Nesse esquema de classificação, os procariotos que normalmente obtêm alimentos só por absorção constituem o reino Monera. O reino Protista inclui os microrganismos eucarióticos unicelulares, que representam os três tipos nutricionais: as algas são fotossintéticas, os protozoários podem ingerir seu alimento e os fungos limosos somente absorvem os nutrientes. Os organismos eucarióticos superiores são colocados no reino Plantae (plantas verdes fotossintéticas e algas superiores), Animalia (animais que ingerem alimentos) e Fungi, organismos que têm parede celular, mas não apresentam o pigmento clorofila encontrado em outras plantas para promover a fotossíntese, portanto eles absorvem os nutrientes. Como pode se observar, os microrganismos pertencem a três dos cinco reinos.

1.5 Principais características dos grupos de microrganismos

Protozoários – são microrganismos eucarióticos unicelulares. Como os animais ingerem partículas alimentares, não apresentam parede celular rígida e não contêm clorofila. Movem-se através de cílios, flagelos ou pseudópode. Estes microrganismos são estudados na ciência da Parasitologia (estudo dos parasitas). São amplamente distribuídos na natureza, principalmen-

te, em ambientes aquáticos. Muitos são nocivos ao homem como a ameba e a giárdia.

Figura 1.10 – Protozoário. http://1.bp.blogspot.com/-We-8wiRGnvY/T_QyJbHRFaI/AAAAAAAAA3Y/We9BtKc55pM/s640/Protozo%C3%A1rio+flagelado.jpg

Algas – são semelhantes às plantas por possuírem clorofila que participa do processo de fotossíntese e apresentam uma parede celular rígida. São eucariotos e podem ser unicelulares ou multicelulares com vários metros de comprimento. Podem ser nocivas por produzirem toxinas, obstruir caixas d'água ou crescerem em piscinas. Entretanto, algumas espécies são usadas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos e para o uso em laboratório. As algas não são estudadas na Microbiologia de alimentos.

Figura 1.11 – Alga. http://www.pensamentoverde.com.br/wp-content/uploads/2014/04/img160.jpg

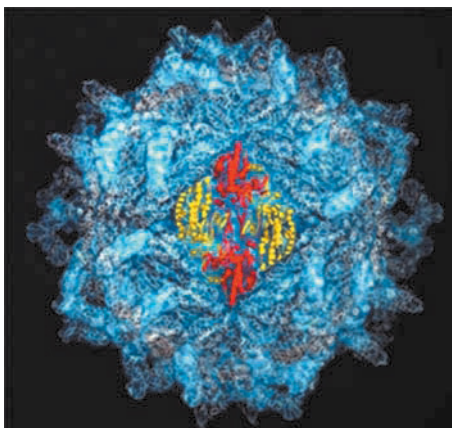
Fungos – podem ser unicelulares ou multicelulares. São eucariotos e possuem parede celular rígida. Os fungos não ingerem alimentos e obtêm os nutrientes do ambiente através de absorção.

Figura 1.12 – Fungos. http://i369.photobucket.com/albums/oo139/Dimitri1985/fungos/flammulina-velutipes.jpg

Bactérias – são procariotos, carecem de membrana nuclear e outras estruturas celulares organizadas observadas em eucariotos.

Figura 1.13 – Bactérias. http://www.responsibletechnology.org/posts/wp-content/uploads/2013/02/gut-bacteria.jpg

Vírus – representam o limite entre as formas vivas e as sem vida. Não são células como as descritas anteriormente, contêm somente um tipo de ácido nucleico, RNA ou DNA que é circundado por um envelope proteico ou capa. Devido à ausência de componentes celulares necessários para o metabolismo ou reprodução independente, o vírus pode multiplicar-se somente dentro de células vivas, por isso não são considerados seres vivos por não possuírem vida própria.

Figura 1.14 – Vírus. http://hypescience.com/wp-content/uploads/2009/02/capa-virus-grande.jpg

1.6 Características das bactérias

1.6.1 Características gerais das bactérias

- São seres unicelulares, aparentemente simples, sem carioteca, ou seja, sem membrana núclear. Há um único compartimento, o citoplasma.
- O material hereditário, uma longa molécula de DNA, está enovelado na região, aproximadamente central, sem qualquer separação do resto do conteúdo citoplasmático. Suas paredes celulares, quase sempre, contêm o polissacarídeo complexo peptideoglicano.

• Usualmente se dividem por fissão binária. Durante este processo, o DNA é duplicado e a célula se divide em duas. A seguir, você irá estudar mais detalhadamente as características de maior importância para o entendimento das aulas seguintes.

1.6.1.1 Tamanho

Invisíveis a olho nu, só podendo ser visualizada com o auxílio do microscópio, as bactérias são normalmente medidas em micrômetros (μm), que são equivalentes a 1/1000mm (10-3mm). As células bacterianas variam de tamanho dependendo da espécie, mas a maioria tem aproximadamente de 0,5 a 1μm de diâmetro ou largura.

1.6.1.2 Morfologia

Há uma grande variedade de tipos de bactérias e suas formas variam, dependendo do gênero da bactéria e das condições em que elas se encontram. Apresentam uma das três formas básicas: cocos, bacilos e espirilos.

Cocos – são células geralmente arredondadas, mas podem ser ovoides ou achatadas em um dos lados quando estão aderidas a outras células. Os cocos quando se dividem para se reproduzir, podem permanecer unidos uns aos outros, o que os classificam em:

Diplococos – são os que permanecem em pares após a divisão.

Estreptococos - são aqueles que se dividem e permanecem ligados em forma de cadeia.

Tétrades – são aqueles que se dividem em dois planos e permanecem em grupos de quatro.

Estafilococos - são aqueles que se dividem em múltiplos planos e formam cachos (forma de arranjo).

Sarcinas – são os que se dividem em três planos, permanecendo unidos em forma de cubo com oito bactérias.

Bacilos – são células cilíndricas ou em forma de bastão. Existem diferenças consideráveis em comprimento e largura entre as várias espécies de bacilos. As porções terminais de alguns bacilos são quadradas, outras arredondadas e, ainda, outras são afiladas ou pontiagudas.

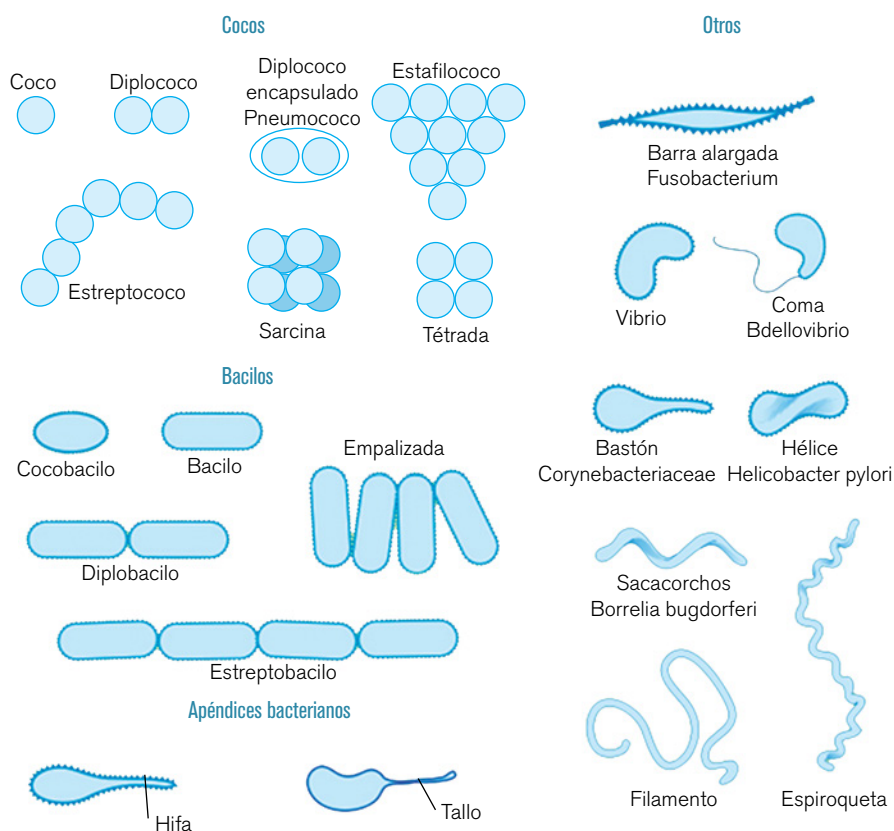



Figura 1.15 – http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Morfolog%C3%A-Da_bacteriana.jpg

1.6.1.3 Estruturas bacterianas

Com a ajuda do microscópio, podemos observar uma diversidade de estruturas, funcionando juntas numa célula bacteriana. Algumas dessas estruturas são encontradas externamente fixadas à parede celular, enquanto outras são internas. A parede celular e a membrana citoplasmática são comuns a todas as células bacterianas.

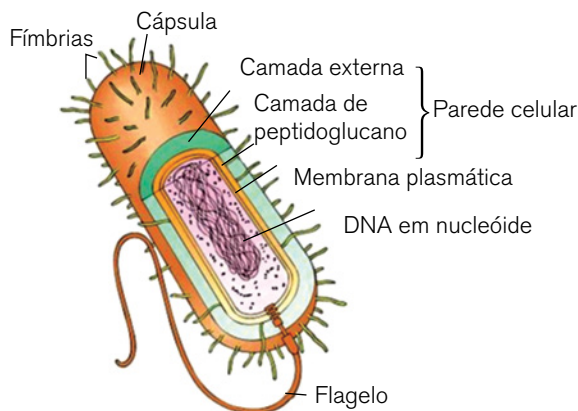



Figura 1.16 – http://s2.glbimg.com/Gna8vkd8Diesm1iyUkE-rltjfUw=/0x0:1274x932/620x454/s.glbimg.com/po/ek/f/original/2013/11/21/modulo_20_-_bacterias_2_reescrita.png

1.6.1.4 Parede celular

A parede celular é uma estrutura rígida que mantém a forma característica de cada célula bacteriana. A estrutura é tão rígida que mesmo altas pressões ou condições físicas adversas raramente mudam a forma das células bacterianas. É essencial para o crescimento e divisão da célula. As paredes celulares das células bacterianas não são estruturas homogêneas, apresentam camadas de diferentes substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria. Elas diferem em espessura e em composição. Além de dar forma à bactéria, a parede celular serve como barreira para algumas substâncias, previne a evasão de certas enzimas, assim como a entrada de certas substâncias químicas e enzimas indesejáveis, que poderiam causar danos à célula. Nutrientes líquidos necessários à célula têm passagem permitida.

1.6.1.5 Membrana citoplasmática

Localiza-se imediatamente abaixo da parede celular. A membrana citoplasmática é o local onde ocorre a atividade enzimática e do transporte de moléculas para dentro e para fora da célula. É muito mais seletiva à passagem de substâncias externas que a parede celular.

1.6.1.6 Estruturas externas a parede celular

Glicocálice

Significa revestimento de açúcar – é um envoltório externo à membrana plasmática que ajuda a proteger a superfície celular contra lesões mecânicas e químicas. É composto de moléculas de açúcar associadas aos fosfolipídios e às proteínas dessa membrana. O glicocálice bacteriano é um polímero viscoso e gelatinoso que está situado externamente à parede celular. Na maioria dos casos, ele é produzido dentro da célula e excretado para a superfície celular. O glicocálice é descrito como uma cápsula.

Em certas espécies, as cápsulas são importantes no potencial de produção de doenças da bactéria. As cápsulas, frequentemente, protegem as bactérias patogênicas da fagocitose pelas células do hospedeiro.

Flagelos e cílios

Flagelo significa chicote – longo apêndice filamentoso que serve para locomoção. Se as projeções são poucas e longas em relação ao tamanho da célula, são denominados flagelos. Se as projeções são numerosas e curtas lembrando pelos, são denominados cílios.

Existem quatro tipos de arranjos de flagelos, que são:

- Monotríquio (um único flagelo polar).
- Anfitríquio (um único flagelo em cada extremidade da célula).
- Lofotríquio (dois ou mais flagelos em cada extremidade da célula).
- Peritríquio (flagelos distribuídos por toda célula).

As bactérias móveis contêm receptores em várias localizações, como dentro ou logo abaixo da parede celular. Estes receptores captam os estímulos químicos, como o oxigênio, a ribose e a galactose. Em resposta aos estímulos, a informação é passada para os flagelos. Se um sinal quimiotático (estímulo químico) é positivo, denominado atraente, as bactérias se movem em direção ao estímulo com muitas corridas e poucos desvios. Se um sinal é negativo, denominado repelente, a frequência de desvios aumenta à medida que a bactéria se move para longe do estímulo.

Filamentos axiais

São feixes de fibrilas que se originam nas extremidades das células e fazem uma espiral em torno destas. A rotação dos filamentos produz um movimento que propele as espiroquetas (bactérias que possuem estrutura e motilidade exclusiva) como a ***Treponema pallidum***, o agente causador da sífilis, em um movimento espiral. Este movimento é semelhante ao modo como o saca-rolha se move, permitindo que as bactérias se movam efetivamente através dos tecidos corporais.

Fimbrias e pili

São apêndices semelhantes a pelos mais curtos, mais retos e mais finos que os flagelos, são usados para fixação em vez de motilidade. Essas estruturas, que distribuídas de modo helicoidal em torno de um eixo central, são divididas em fimbrias e pili, possuindo funções diversas. As fimbrias permitem as células aderir às superfícies, incluindo as de outras células. As fimbrias de bactérias Neisseria gonorhoeae, o agente causador da gonorreia, auxiliam o micróbio a colonizar as membranas mucosas e uma vez que a colonização ocorre, as bactérias podem causar doenças.

Os pili (singular pilus), normalmente, são mais longos que as fimbrias, havendo apenas um ou dois por célula. Os pili unem-se as células.

Área nuclear ou nucleoide

Contém uma única molécula circular longa de DNA de dupla fita, o cromossomo bacteriano. É a formação genética da célula que transporta toda informação necessária para as estruturas e as funções celulares bacterianas na preparação para transferência de DNA de uma célula para outra.

Ribossomos

Servem como locais de síntese proteica. São compostos de duas subunidades, cada qual consistindo de proteínas e de um tipo de RNA denominado ribossômico (RNAr). Os ribossomos procarióticos diferem dos eucarióticos no número de proteínas e de moléculas de RNA. Devido a essa diferença, a célula microbiana pode ser morta pelo antibiótico, enquanto a célula do hospedeiro eucariótico permanece intacta.

Esporos

Os esporos se formam dentro da célula bacteriana, chamada de endósporos, são exclusivos de bactérias. São células desidratadas altamente duráveis, com paredes espessas e camadas adicionais.

Os gêneros Bacillus e Clostridium podem apresentar esporos, estruturas que constituem formas de defesa e não devem ser confundidas com unidades reprodutivas. Na forma de esporos, essas bactérias têm a capacidade de resistir à ação de agentes químicos diversos, às temperaturas inadequadas, aos meios de radiação, ácidos e outras condições desfavoráveis.

Plasmídeos

São moléculas de DNA de dupla fita pequenas e circulares. Não estão conectados ao cromossomo bacteriano principal e replicam-se, independentemente, do DNA cromossômico. Podem ser ganhos ou perdidos sem lesar a celular e transferidos de uma bactéria para outra. Podem transportar genes para atividades como a resistência aos antibióticos, tolerância aos metais tóxicos, produção de toxinas e síntese de enzimas. Quanto mais alto o peso molecular maior será sua importância. Cada plasmídeo tem uma função própria, os que não têm função são crípticos e apresentam baixo peso molecular.

Reprodução

Quando os microrganismos estão em um meio apropriado (alimentos, meios de cultura, tecidos de animais ou plantas) e em condições ótimas para o crescimento, um grande aumento no número de células ocorre em um período de tempo relativamente curto. A reprodução das bactérias se dá, principalmente, de forma assexuada, em que novas células iguais a que deu origem são produzidas. As bactérias se reproduzem assexuadamente por fissão binária, na qual uma única célula parental simplesmente se divide em duas células filhas idênticas. Anteriormente à divisão celular, os conteúdos celulares se duplicam e o núcleo é replicado. O tempo de geração, ou seja, o intervalo de tempo requerido para que cada microrganismo se divida ou para que a população de uma cultura duplique em número é diferente para cada espécie e é fortemente influenciado pela composição nutricional do meio em que o microrganismo se encontra.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=fQBt3U189lk

Alguns procariotos se reproduzem assexuadamente por modelos de divisão celular diferentes da fissão binária, tais como:

- Brotamento – a célula-mãe expele, de forma lenta, uma célula-filha que brota de maneira a originar uma nova bactéria. As células-filhas podem se manter agregadas às células-mães, após sucessivos brotamentos forma-se uma colônia.
- Fragmentação – formação de filamentos, cada um deles inicia o crescimento de uma nova célula. Ex. Nocardia sp
- Formação de esporos – produção de cadeias de esporos externos.

1.7 Divisão das bactérias

As bactérias são divididas em dois grandes grupos: as eubactérias e as arqueobactérias. As eubactérias apresentam composição da parede celular diferente das arqueobactérias, frequentemente aparecem aos pares, em cadeias, formando tétrades ou agrupadas. Algumas apresentam flagelos, favorecendo seu deslocamento rapidamente em líquidos. São de grande importância na natureza e na indústria, sendo essenciais na reciclagem de lixo orgânico e na produção de antibiótico como a streptomicina. As infecções causadas pelas eubactérias incluem as estreptocócica de garganta, tétano, peste, cólera e tuberculose.

As arqueobactérias assemelham-se as eubactérias quando observadas por meio de um microscópio, mas existem diferenças importantes quanto a sua composição química, à atividade e ao meio ambiente em que se desenvolvem tais como em elevada concentração de salina ou acidez elevada e altas temperaturas a exemplo de piscinas térmicas e lagoas salinas.

1.7.1 Fungos e virus

Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e, geralmente, multicelulares. São encontrados na superfície de alimentos, formando colônias algodonosas e coloridas.

Os mais conhecidos são os bolores, os cogumelos, as orelhas-de-pau e as leveduras (fermentos). Os fungos, em sua maioria, são constituídos por filamentos microscópicos e ramificados, as hifas. O conjunto de hifas de um fungo constitui o micélio. Os fungos têm nutrição heterotrófica porque necessitam de matéria orgânica, provenientes dos alimentos, para obtenção de seus nutrientes.

A maioria vive no solo, alimentando-se de cadáveres de animais, de plantas e de outros seres vivos. Esse modo de vida dos fungos causa o apodrecimento de diversos materiais e por isso são chamados de saprofágicos. Certas espécies de fungos são parasitas e outras vivem em associações harmoniosas com outros organismos, trocando benefícios.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=qjg6nbS7CFg

1.7.2 Características dos fungos em relação às bactérias

Os fungos são geralmente adaptados a ambientes que poderiam ser hostis às bactérias. São encontrados na superfície de alimentos formando colônias algodonosas e coloridas. Todavia, diferem das bactérias em determinadas necessidades ambientais e nas características estruturais e nutricionais apresentadas a seguir:

- Apresentam a parede celular com presença de substâncias quitinosas e células com organelas membranosas (mitocôndrias, complexo de golgi, vacúolo).
- Não possuem células móveis em todos os estágios do ciclo de vida.
- Reserva de energia na forma de glicogênio.

- Os fungos normalmente crescem melhores em ambientes em que o pH é muito ácido, o qual são desfavoráveis para o crescimento da maioria das bactérias comuns.
- Quase todos possuem forma aeróbica. Algumas leveduras são anaeróbicas facultativas.
- A maioria dos fungos é mais resistente à pressão osmótica que as bactérias; muitos, consequentemente, podem crescer em altas concentrações de açúcar ou sal.
- Podem crescer sobre substâncias com baixo grau de umidade, geralmente tão baixo que impede o crescimento de bactérias.
- Necessitam de menos nitrogênio para um crescimento equivalente ao das bactérias.
- São capazes de metabolizar a carboidratos complexos, tais como lignina (madeira), que as bactérias não podem utilizar como nutriente.

As características citadas, anteriormente, nos mostram que os fungos se desenvolvem em substratos diversos como paredes de banheiro, couro de sapatos e jornais velhos.

1.7.3 Modo de vida dos fungos de acordo com o tipo de alimentação

Os fungos apresentam grande variedade em relação aos modos de vida, mas sempre obtêm alimento por absorção de nutrientes do meio.

- **Decompositores** – os fungos decompositores obtêm seus alimentos pela decomposição de matéria orgânica. Eles podem atuar como saprófagos, degradando a matéria orgânica presente no corpo de organismos mortos.
- **Parasitas** – são parasitas os fungos que se alimentam de substâncias retiradas do corpo de organismos vivos, nos quais se instalam, prejudicando-os. Esses fungos provocam doenças em plantas e em animais, inclusive no ser humano.
- **Mutualísticos** – certas espécies de fungos estabelecem relações mutualísticas com outros organismos, nos quais ambos se beneficiam. Dentre os fungos mutualísticos, alguns vivem associados a raízes de plantas formando as micorrizas (raízes que contêm fungos). Nesses casos, elas absorvem água do solo, degradam a matéria orgânica e absorvem os nutrientes liberados, transferindo

parte deles para a planta, que cresce mais sadia. Esta, por sua vez, cede ao fungo certos açúcares e aminoácidos de que ele necessita como alimento.

• **Predadores** – entre os fungos mais especializados estão os predadores, que desenvolvem vários mecanismos para capturar pequenos organismos, especialmente nematódeos, utilizando-os como alimento.

1.7.4 Tipos de reprodução

Assexuada

• Ocorre pela fragmentação do micélio, brotamento, cissiparidade ou produção de esporos assexuais.

• Não ocorre fusão de núcleos, apenas mitoses sucessivas.

• Mitose - divisão celular na qual os cromossomos das células são duplicados e as células formadas apresentam a mesma constituição genética.

• Este tipo de reprodução corresponde à fase imperfeita, também chamada de anamórfica dos fungos.

Sexuada

• Aumenta a variabilidade genética, pois os indivíduos formados podem apresentar constituição genética diferente.

• Corresponde à fase perfeita ou teleomórfica dos fungos.

• Envolve a ocorrência de três processos:

Plasmogamia: Fusão de protoplasmas, resultante da anastomose de duas células

Cariogamia: Fusão de dois núcleos haploides (n) e compatíveis formando um núcleo diploide (2n)

Meiose: Núcleo diploide (2n) sofre divisão reducional após a cariogamia para formar dois núcleos haploides (n)

1.7.5 Diversidade morfológica dos fungos

Fungos unicelulares (leveduras)

• Células ovais ou esféricas – 1 a 10 µm.

• Reprodução por brotamento ou cissiparidade.

• Crescimento geralmente rápido formando colônias cremosas ou membranosas e ausência de hifas aéreas.

• Em determinadas condições, células em reprodução permanecem ligadas à célula-mãe, formando pseudo-hifas.

Fungos filamentosos (bolores)

• Multicelulares formados por estruturas tubulares (hifas – 2 a 10 μm) o conjunto dessas estruturas constitui o micélio.

• As hifas podem ser contínuas (cenocíticas ou asseptadas) ou apresentar divisões transversais (hifas septadas).

Fungos dimórficos

• Apresentam em determinadas condições a fase leveduriforme (37 °C, alta tensão de CO_2) e em outras a fase filamentosa.

• A fase de levedura se reproduz por brotamento, enquanto que a fase filamentosa produz hifas aéreas e vegetativas.

• O dimorfismo nos fungos dependente da temperatura de crescimento. Crescido a 37 °C, o fungo apresenta forma de levedura. Crescido a 25 °C, ele apresenta a forma filamentosa.

Observe em alimentos com colônias de fungos (pães, extrato de tomate, tomates, queijo e outros), as hifas que em conjunto formam o micélio, e as diversas colorações.

Vírus

Os vírus não são considerados organismos vivos porque são inertes fora das células hospedeiras. Diferem dos demais seres vivos pela ausência de organização celular, por não possuírem metabolismo próprio e por necessitarem de uma célula hospedeira. No entanto, quando penetram em uma célula hospedeira, o ácido nucleico viral torna-se ativo ocorrendo a multiplicação.

Características dos vírus

• Possuem um único tipo de ácido nucleico, DNA ou RNA.

• Possuem uma cobertura proteica, envolvendo o ácido nucleico.

• Multiplicam-se dentro de células vivas, usando a maquinaria de síntese das células.

• Induzem a síntese de estruturas especializadas, capazes de transferir o ácido nucleico viral para outras células.

• Parasitas obrigatórios apresentando incapacidade de crescer e se dividir autonomamente.

• Replicação somente a partir de seu próprio material genético.

Estrutura viral

Um vírion é uma partícula viral completa, composta por um meio ácido nucleico, envolto por uma cobertura proteica que protege do meio ambiente e serve como veículo na transmissão de um hospedeiro para o outro. Os vírus são classificados de acordo com as diferenças na estrutura desses envoltórios.

Capsídeo e envelope

O ácido nucleico dos vírus é envolvido por uma cobertura proteica chamada de capsídeo. A estrutura deste é denominada pelo genoma viral e constitui a maior parte da massa viral. O capsídeo é formado por subunidades protéicas chamadas de capsômeros. Em alguns vírus, o capsídeo é coberto por um envelope que, consiste de uma combinação de lipídios, proteínas e carboidratos. Alguns vírus animais saem do hospedeiro por um processo de extrusão, no qual a partícula é envolvida por uma camada de membrana plasmática celular que vai constituir o envelope viral. Os vírus cujos capsídeos não estão cobertos por um envelope são conhecidos como vírus não-envelopados.

Classificação morfológica

Podem ser classificados com base na arquitetura do capsídeo.

– Vírus helicoidais – O genoma viral está no interior de um capsídeo cilíndrico oco com estrutura helicoidal.

– Vírus poliédricos – O capsídeo da maioria deles tem a forma de um icosaedro. São exemplos o adenovírus e o poliovírus.

– Vírus envelopados – o capsídeo é coberto por um envelope.

– Vírus complexos – alguns vírus, especialmente os bacterianos, possuem estruturas complicadas e por isso são denominados complexos. Um bacteriófago ou gagos (vírus que atacam bactérias) é um exemplo de vírus complexo. Um fago é capaz de aderir à parede celular de uma bactéria hospedeira, perfurando-a e nela injetando seu DNA. O capsídeo proteico do fago, formado por uma “cabeça” e uma “cauda”, permanece fora da bactéria.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=N8zalonz8C4

Multiplicação de bacteriófagos

O ciclo de vida viral mais conhecido é o dos bacteriófagos, que podem se multiplicar por dois mecanismos alternativos: o ciclo lítico (termina com a morte da célula hospedeira) ou ciclo lisogênico (a célula permanece viva).

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=DU2CXTjsgXQ

REFLEXÃO

A Microbiologia como ciência

Muitos curiosos e cientistas contribuíram para o estudo da Microbiologia como ciência. Seu início se deu na segunda metade do século XIX, quando os cientistas provaram que os microrganismos originaram-se de pais iguais a eles próprios e não de causas sobrenaturais ou de plantas e animais em putrefação, como na teoria de geração espontânea. A Microbiologia preocupa-se com o estudo dos microrganismos e de suas atividades. Estuda a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação dos seres microscópicos. Estuda sua distribuição natural, suas relações recíprocas e com outros seres vivos, seus efeitos benéficos e prejudiciais sobre os homens e as alterações físicas e químicas que provocam em seu meio ambiente. Em sua maior parte, a Microbiologia trata com organismos microscópicos unicelulares. Nos indivíduos unicelulares todos os processos vitais são realizados numa única célula. Independentemente da complexidade de um organismo, a célula é, na verdade, a unidade básica da vida. No processo de reprodução, os organismos vivos mantêm uma identidade de espécie, possuindo potencialidades de alterações, buscando encontrar um modo especial de sobreviver.

LEITURA

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200696/pdf/bumc0018-0021.pdf

http://pt.wikipedia.org/wiki/Louis_Pasteur

https://www.youtube.com/watch?v=EnlBK8WjMwk

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ILDEU DE CASTRO MOREIRA. **Robert Hooke 1635-1703**, (Físico, professor do Instituto de Física da UFRJ e Jornalista da Folha de SP), 2003.

RIEDEL S. Edward **Jenner and the history of smallpox and vaccination**. Proc (Bayl Univ Med Cent). Jan;18(1):21-5, 2005.

TRABULSI, ALTERTHUM. **Microbiologia**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PELCZAR, CHAN, KRIEG. **Microbiologia: conceitos e aplicacoes**. 2ª Ed. São Paulo: Makron, 1997.

MIMIS. **Microbiologia Médica**. 3a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.

2

Fisiologia Bacteriana e Metabolismo Bacteriano

OBJETIVOS

- Reconhecer elementos da nutrição microbiana, ecologia e crescimento;
- Estudar o crescimento microbiano (Curva de crescimento);
- Conhecer o Metabolismo microbiano;
- Conhecer os princípios da Biologia Molecular Microbiana.

2.1 Fisiologia Bacteriana e Metabolismo Bacteriano

2.1.1 Elementos da nutrição microbiana, ecologia e crescimento.

O crescimento e divisão celulares necessitam de um ambiente propício com todos os constituintes químicos e físicos necessários para o seu metabolismo. Essas necessidades específicas são dependentes de informações genéticas para cada espécie bacteriana. Algumas espécies com vasta flexibilidade nutricional, como as Pseudomonas, são capazes de sintetizar muitos de seus metabólitos a partir de precursores simples, enquanto outras espécies são mais exigentes, como as Porphyromonas e Treponemas, que necessitam de nutrientes complexos para o crescimento e reprodução.

2.1.2 Fontes dos nutrientes essências

A análise das estruturas bacterianas revela que sua arquitetura é formada por diferentes macromoléculas, em particular, proteínas e ácidos nucleicos. Os precursores das macromoléculas podem ser retirados do meio ambiente ou ser sintetizados pelas bactérias a partir de compostos mais simples. A alternativa escolhida vai depender da disponibilidade do composto no meio e da capacidade de síntese do microrganismo. As substâncias ou elementos retirados do ambiente e usados para construir novos componentes celulares ou para obter energia são chamados nutrientes. Os nutrientes podem ser divididos em duas classes, macronutrientes e micronutrientes.

Macronutrientes e Micronutrientes. Ambos os tipos são imprescindíveis, mas os primeiros são requeridos em grandes quantidades por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos celulares e / ou serem utilizados como combustível.

2.1.2.1 Macronutrientes:

- **Carbono**: está presente na maioria das substâncias que compõem as células. As bactérias podem utilizar o carbono inorgânico existente no ambiente, na forma de carbonatos ou de CO_2 como única fonte de carbono. São neste

caso chamadas de autotróficas. Os microrganismos que obrigatoriamente requerem uma fonte orgânica de carbono são denominados heterotróficos e as principais fontes, são os carboidratos.

- **Oxigênio**: é requerido na forma molecular como aceptor final na cadeia de transporte de elétrons aeróbia. Também é elemento importante em várias moléculas orgânicas e inorgânicas.
- **Hidrogênio**: como componente muito frequente da matéria orgânica e inorgânica, também constitui um elemento comum de todo material celular.
- **Nitrogênio**: é componente de proteínas e ácidos nucléicos, além de vitaminas e outros compostos celulares. Está disponível na natureza sob a forma de gás (N_2) ou na forma combinada. Sua utilização como N_2 é restrita a um grupo de bactérias cujo principal habitat é o solo. Na forma combinada, o nitrogênio é encontrado como matéria inorgânica (NH_3, NO_3, etc.) ou matéria orgânica: aminoácidos, purinas e pirimidinas.
- **Enxofre**: faz parte de aminoácidos (cisteína e metionina), de vitaminas e grupos prostéticos de várias proteínas importantes em reações de óxido-redução. Da mesma forma que o nitrogênio, o enxofre pode ser encontrado no ambiente nas formas elementar, oxidada e reduzida; estas duas últimas aparecem como compostos orgânicos e inorgânicos. Todas as alternativas citadas podem ser utilizadas pelas bactérias, porém são os sulfatos (SO_4^{-2}) inorgânicos ou os aminoácidos as formas preferencialmente assimiladas. Na forma oxidada, também pode ser aceptor final de elétrons das cadeias de transporte de elétrons anaeróbias.
- **Fósforo**: é encontrado na célula na forma combinada a moléculas importantes como os nucleotídeos (ATP, CTP, GTP, UTP, TTP) e como fosfato inorgânico; nesta última forma é incorporado através de poucas reações metabólicas, embora uma delas seja de fundamental importância: a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato. As substâncias fosforiladas podem estar envolvidas com o armazenamento de energia (como o ATP) ou atuar como reguladoras de processos metabólicos: muitas enzimas tornam-se ativas ao serem fosforiladas.

2.1.2.2 Micronutrientes:

Os elementos ferro, magnésio, manganês, cálcio, zinco, potássio, sódio, cobre, cloro, cobalto, molibdênio, selênio e outros são encontrados sempre na forma inorgânica, fazendo parte de minerais. São necessários ao desenvolvimento

microbiano, mas em quantidades variáveis, dependendo do elemento e do microrganismo considerados.

Os micronutrientes podem atuar de diferentes maneiras, incluindo as seguintes funções principais:

- Componentes de proteínas, como o ferro que participa da composição de várias proteínas enzimáticas ou não, de citocromos, etc.;
- Cofatores de enzimas, como o magnésio, potássio, molibdênio, etc;
- Componentes de estruturas, como o cálcio, presente em um dos envoltórios dos esporos;
- Osmorreguladores.

2.1.3 Estudo do crescimento microbiano

Para se cultivar microrganismos deve-se obedecer a requisitos básicos obrigatórios, quais sejam incubá-los em meios de cultura adequados e incubá-los em condições ambientais igualmente adequadas.

Um inóculo é uma amostra de material contendo geralmente uma pequena quantidade de microrganismos; obedecidas as condições citadas, os microrganismos contidos no inóculo multiplicam-se, aumentando em número e massa e, com isto, atingindo o objetivo desejado.

2.1.4 Meios de Cultura

Meio de cultura é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento microbiano. Basicamente deve conter a fonte de energia e de todos os elementos imprescindíveis à vida das células. A formulação de um meio de cultura deve levar em conta o tipo nutritivo no qual o microrganismo pertence, considerando-se a fonte de energia (luz ou substância química), o substrato doador de elétrons (orgânico ou inorgânico) e a fonte de carbono (orgânica ou inorgânica). Estabelecidas as condições gerais, o meio de cultura deve ainda atender as necessidades específicas do grupo, da família, do gênero ou da espécie que se deseja cultivar. Assim, é imprescindível acrescentar ao meio vitaminas, cofatores, aminoácidos, etc., quando estes compostos não são sintetizados pelos microrganismos que se deseja cultivar.

2.1.5 Fatores de crescimento

Entre as bactérias heterotróficas há uma imensa variedade de exigências nutritivas. Algumas são capazes de crescer em meio muito simples, constituído de uma solução de glicose, sal de amônio e alguns sais minerais. A partir desses compostos, sintetizam todos os componentes do protoplasma: proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos, coenzimas, etc. Outras, todavia, são incapazes de sintetizar determinados compostos orgânicos essenciais para o seu metabolismo. Para que estes microrganismos possam crescer, tais compostos devem ser obtidos do meio natural ou artificial em que vivem. Essas substâncias são denominadas fatores de crescimento. Muitos desses fatores são componentes de coenzimas, que, para o homem, são vitaminas. Na realidade, certas vitaminas, como o ácido fólico, foram descobertas por serem necessárias ao crescimento de determinadas bactérias. As composições dos meios de cultura, portanto, podem ser muito variadas. Um meio pode ter uma composição simples, contendo um único carboidrato como fonte de energia e carbono e alguns sais minerais; em outro extremo estão os meios requeridos por microrganismos mais exigentes, apresentando composição complexa, contendo várias fontes de carbono e energia, vitaminas e aminoácidos, podendo ainda ser acrescidos de sangue ou soro de animais.

Além da composição qualitativa, o meio de cultura deve obedecer aos limites de quantidade de cada componente suportáveis pelos microrganismos.

Muitas vezes o meio de cultura deve conter substâncias para neutralizar a ação de produtos tóxicos lançados pelos próprios microrganismos, que sofrem os efeitos de seu acúmulo. Um exemplo rotineiro é adição de tampões para impedir a queda de pH provocada pelos ácidos orgânicos produzidos por fermentação bacteriana.

2.1.5.1 Classificação dos meios de cultura:

1. Quanto a composição

- Meio quimicamente definido
- Meio complexo

2. Quanto a consistência

Os meios podem ser líquidos, quando são uma solução aquosa de nutrientes, semissólidos, ou sólidos, quando a solução aquosa é gelificada por um polissacarídeo extraído de algas, o ágar.

O meio sólido é obrigatoriamente usado quando se pretende separar células. Cada célula individualizada ou agrupamento isolado dá origem, por multiplicação, a um aglomerado que constitui uma colônia. Colônias de diferentes espécies geralmente apresentam características morfológicas diferentes.

3. Quanto a função

- Enriquecidos ou de enriquecimento
- Seletivos

Os meios de cultura podem ser seletivos, quando contêm uma substância que inibe o crescimento de um determinado grupo de microrganismos, mas permite o desenvolvimento de outros.

- Diferenciais

2.1.6 Influência de fatores ambientais

A tomada de nutriente e posterior metabolismo é influenciada por fatores físicos e químicos do meio ambiente. Os principais fatores são: temperatura, pH, presença de oxigênio, pressão osmótica e luz.

Temperatura

Cada tipo de bactéria apresenta uma temperatura ótima de crescimento, em torno desta temperatura observa-se um intervalo dentro do qual o desenvolvimento também ocorre, sem, no entanto, atingir o seu máximo. Ultrapassado o limite superior, rapidamente ocorre desnaturação do material celular e, conseqüentemente, a morte da célula. As temperaturas inferiores à ótima levam a uma desaceleração das reações metabólicas, com diminuição da velocidade de multiplicação celular, que em caso extremo, fica impedida.

As variações quanto ao requerimento térmico permite classificar as bactérias segundo a temperatura ótima para o seu crescimento, em:

- psicrotrófilas
- psicrófilas: entre 12 e 17 °C
- mesófilas: entre 28 e 37 °C
- termófilas: 57 e 87 °C
- hipertermófilas
- termófilos extremos

Embora grupos excêntricos, que necessitam de altas temperaturas para o seu crescimento, a maioria concentra-se no grupo de mesófilas, principalmente as de interesse médico, veterinário e agronômico.

pH

Os valores de pH em torno da neutralidade são os mais adequados para absorção de alimentos para a grande maioria das bactérias. Existem, no entanto, grupos adaptados a viver em ambientes ácidos e alcalinos.

Oxigênio

O oxigênio pode ser indispensável, letal ou inócuo para as bactérias, o que permite classificá-las em:

- Aeróbias estritas: exigem a presença de oxigênio, como as do gênero Acinetobacter.
- Microaerófilas: necessitam de baixos teores de oxigênio, como o ***Campylobacter jejuni***.
- Facultativas: apresentam mecanismos que as capacitam a utilizar o oxigênio quando disponível, mas desenvolver-se também em sua ausência. ***Escherichia coli*** e várias bactérias entéricas tem esta característica.
- Anaeróbias estritas: não toleram o oxigênio. Ex.: Clostridium tetani, bactéria produtora de potente toxina que só se desenvolve em tecidos necrosados carentes de oxigênio.
- Aerotolerantes: suportam a presença de oxigênio, sem utilizá-lo em seu metabolismo. Por exemplo, a bactéria ***Lactobacillus acidophillus***.

Exoenzimas

A seletividade da membrana citoplasmática impede que macromoléculas como proteínas, amido, celulose e lipídeos sejam transportadas para o interior da célula. Para essas moléculas serem utilizadas pelos microrganismos, é necessário cindidas, dando origem a compostos menores, aos quais as membranas são permeáveis.

A quebra das moléculas é promovida por enzimas hidrolíticas, denominadas exoenzimas por atuarem fora da membrana citoplasmática. As exoenzimas apresentam especificidade pelo substrato, atuando sobre proteínas ou amidos, ou determinados lipídeos, e constituem um fator de virulência, uma

vez que podem hidrolisar componentes estruturais de tecidos, conferindo ao microrganismo capacidade invasora e de permanência em outros organismos vivos.

Além de estarem associadas à nutrição dos microrganismos, as exoenzimas podem contribuir para a sua sobrevivência, uma vez que catalisam a hidrólise de substâncias que lhes são tóxicas ou mesmo letais.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=fq6Psf-cQME

2.2 Estudo do crescimento microbiano

2.2.1 Reprodução bacteriana

– Crescimento: aumento do protoplasma celular pela síntese de ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos; e, absorção de água e eletrólitos. Termina na divisão celular.

– Multiplicação: resposta necessária à pressão de crescimento.

2.2.2 Modo de reprodução

– Cissiparidade: formação de um septo equatorial na região do mesossomo e divisão da célula-mãe, em duas células filhas. "Cocos" em qualquer direção, "bacilos e espirilos", no sentido transversal.

2.2.3 Curva de crescimento bacteriano

Embora as bactérias desenvolvam-se bem em meios de cultura sólidos , os estudos de crescimento são feitos essencialmente em meios líquidos e as considerações que seguem são válidas para essas condições.

Quando uma determinada bactéria é semeada num meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva definida e característica.

Fase lag (A): esta fase de crescimento ocorre quando as células são transferidas de um meio para outro ou de um ambiente para outro. Esta é a fase de ajuste e representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente. As células nesta fase aumentam no volume total em quase duas ou quatro vezes, mas não se dividem pois as Células estão sintetizando DNA, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão.

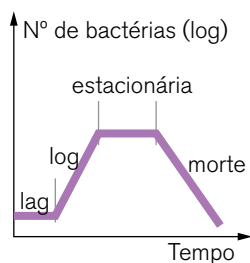
Fase exponencial ou log (B): nesta fase, as células estão se dividindo a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. Os componentes celulares como RNA, proteínas, peso seco e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante. Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase Lag. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final devido à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos.

Fase estacionária (C): durante esta fase, há rápido decréscimo na taxa de divisão celular. Eventualmente, o número total de células em divisão será igual ao número de células mortas, resultando na verdadeira população celular estacionária. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogênio, amido e lipídeos.

Fase de morte ou declínio (D): quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam em números elevados. Nesta fase o meio se encontra deficiente em nutrientes e ricos em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos.

Figura 2.1 – http://www.oocities.org/capecanaveral/lab/6969/grafico.gif

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=wDFMtsPFBrQ

2.3 Metabolismo Bacteriano

Uma vez garantidos pelo ambiente os nutrientes e as condições adequadas para assimilá-los, as bactérias vão absorvê-los e transformá-los para que cumpram suas funções básicas, quais sejam, o suprimento de energia e de matéria prima. Como matéria-prima, os nutrientes vão ser transformados em estruturas celulares ou em moléculas acessórias à sua síntese e funcionamento.

2.3.1 Obtenção de energia

As substâncias com alto valor energético são sempre aquelas com elevado grau de redução, e grande parte das bactérias (exceção às fotossintetizantes) vai obter toda energia de que necessita por oxidação desses substratos. As substâncias preferencialmente oxidadas por microrganismos são os açúcares, seguidos de proteínas, peptídeos e, mais raramente, as gorduras.

As bactérias utilizam energia para o transporte de nutrientes, o movimento dos flagelos, mas, sobretudo para as biossínteses. Wieland (1912) reconheceu que a maioria das reações biológicas, ocorre na ausência de oxigênio, por desidrogenação. Em biologia, pode-se dizer que a perda de um elétron equivale a perda de um hidrogênio. Pode-se, então, definir oxidação como o ganho de um hidrogênio e redução como a perda de um hidrogênio.

2.3.2 Fermentação

Metabolismo no qual os compostos orgânicos servem como doadores e receptores de elétrons (hidrogênio). A fermentação conduz, geralmente, à cisão parcial de moléculas de glicose (glicólise).

Conceito antigo (clássico): decomposição microbiana de carboidratos na ausência de oxigênio.

Dentre os vários tipos de fermentação, pode-se citar:

- Fermentação homolática: produção de ácido lático como produto final;
- Fermentação alcoólica: produção de álcool como produto final;
- Fermentação mista: produção de álcool, ácido e gás;
- Fermentação butileno-glicólica: produção do butileno glicol (não ácido) como produto final.

2.3.3 Putrefação

Decomposição de compostos nitrogenados (proteínas), utilizando-se de substância orgânica como aceptor-doador de elétrons. É um tipo de fermentação que produz produtos finais de odor desagradável: indol, escatol, ácido sulfídrico.

2.3.4 Respiração celular

A respiração celular é o principal processo de geração de ATP em que moléculas são oxidadas e o aceptor final de elétrons quase sempre é uma molécula inorgânica. Ela pode ser de dois tipos: respiração **aeróbia**, quando o aceptor final de elétrons é o O_2, e **anaeróbia**, quando o aceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica que não o oxigênio molecular ou, raramente, uma molécula orgânica.

Respiração aeróbia: Na respiração aeróbia o ácido pirúvico produto da glicólise, é convertido a CO_2 e H_2O, com um grande saldo energético de 36 ATP em eucariotos e 38 ATP em procariotos. Após a glicólise, o composto formado passa por uma série de reações bioquímicas, chamada de ciclo de Krebs, no qual libera CO_2 na atmosfera. Após essa fase, compostos altamente energéticos (coenzimas reduzidas a NADH e $FADH_2$) sofrem uma série de reduções em processos de reações, chamados de cadeia transportadora de elétrons, no quais as moléculas de H^+ são entregues ao oxigênio, resultando na formação de água e liberação de energia. Para que o ácido pirúvico entre no ciclo de Krebs, ele precisa perder uma molécula de CO_2 e se tornar um composto de dois carbonos, chamado de grupo acetil, em um processo de descarboxilação. Esse grupo acetil se liga à coenzima A, formando

o complexo acetil coenzima A (acetil CoA). Nesse processo, o ácido pirúvico também é oxidado e NAD+ é reduzido a NADH. Quando o acetil CoA entra no ciclo de Krebs, o CoA se desliga do grupo acetil, ligando-se ao ácido oxalacético (de quatro carbonos), para formar o ácido cítrico, que é o primeiro passo do ciclo de Krebs.

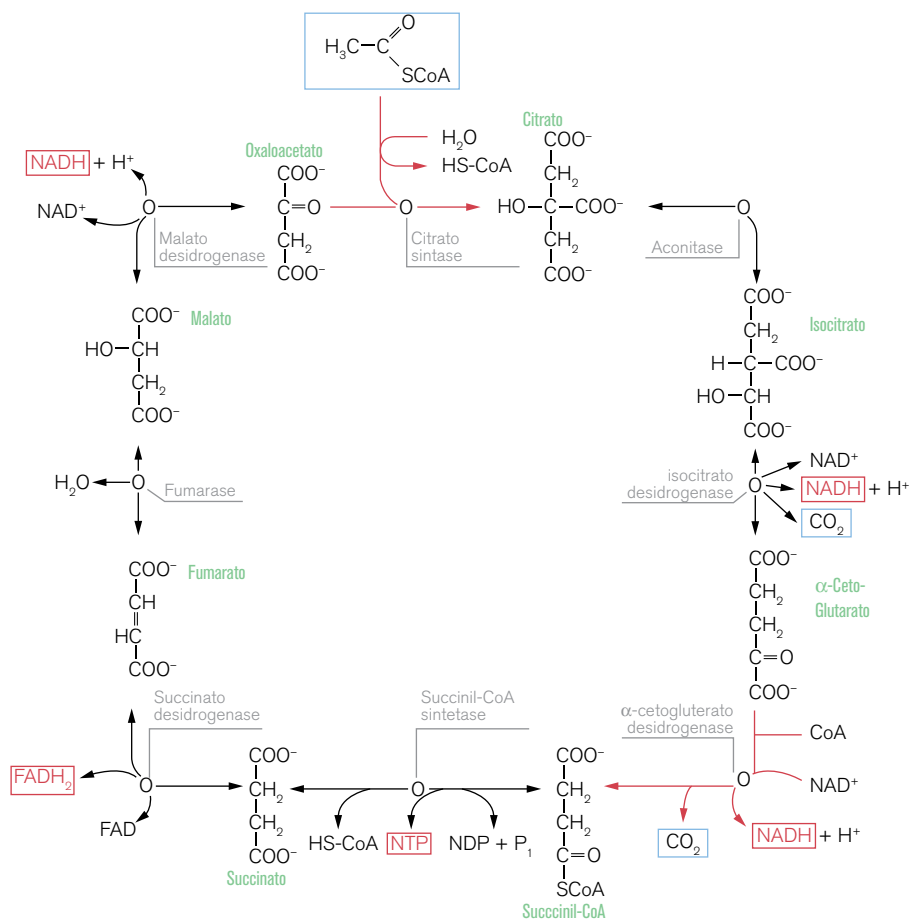



Figura 2.2 – Reação global: 2 ácidos pirúvicos → $6\ CO_2 + 2\ FADH_2 + 8\ NADH_2 + 2\ ATP$

As reações químicas no ciclo de Krebs ocorrem em muitas categorias gerais, como a descarboxilação do ácido isocítrico (6C) a ácido α-cetoglutárico (5C). Outra categoria geral de reação química é a oxidação-redução, como a oxidação do ácido isocítrico, do ácido α-cetoglutárico, do ácido succínico e do ácido málico. Ou seja, átomos de hidrogênio são liberados no ciclo de Krebs e capturados pelas coenzimas NAD+ e FAD. Na cadeia transportadora de elétrons há uma gradual liberação da energia armazenada no NADH e no $FADH_2$, que será utilizada na geração quimiosmótica de ATP. Nessa cadeia as moléculas transportadoras podem ser de três classes: flavoproteínas (uma importante coenzima flavina é a flavina mononucleotídeo – FMN), citocromos (proteína contendo um grupo ferro) e ubiquinonas ou coenzima Q (transportadoras não-protéicas). Essa etapa da respiração aeróbia é conduzida nos organismos eucariotos nas mitocôndrias e nos procariotos ocorre na membrana celular. O primeiro passo na cadeia transportadora de elétrons é a transferência dos elétrons do NADH ao FMN, sendo este reduzido a $FMNH_2$. Os dois H^+ do $FMNH_2$ atravessam para o outro lado da membrana por transporte ativo (bombeamento) e dois elétrons são transferidos para a coenzima Q. O segundo passo é a transferência dos elétrons da coenzima Q aos citocromos, sucessivamente nesta ordem: citb, citc1, citc, cita e cita3. O último citocromo transfere elétrons para o O_2, que, ao se tornar negativo, absorve prótons (H^+) do meio intracelular para formar H_2O.

Respiração anaeróbia: Na respiração anaeróbia o aceptor final de elétrons é diferente do O_2. Em Pseudomonas e Bacillus, por exemplo, o aceptor final é um íon nitrato (NO_3^-). Outras bactérias, como Desulfovibrio, utilizam sulfato (SO_4^{-2}) e outras, carbonato (CO_3^{-2}). O rendimento energético na respiração anaeróbia é menor em relação à respiração aeróbia, consequentemente, organismos anaeróbicos tendem a crescer mais lentamente que os aeróbios. Uma vantagem do uso de aceptores finais de elétrons diferentes de O_2 é permitir aos microrganismos respirarem em ambientes com escassez de oxigênio, como nos sedimentos ou próximo de nascentes hidrotermais submarinas, o que é importante do ponto de vista ecológico.

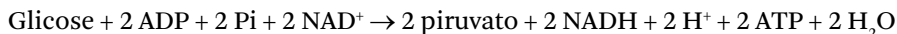
Diante da utilização ou não do O_2 como aceptor final de elétrons, os microrganismos podem ser classificados como oxibiontes (utilzam o O_2) ou anoxibiontes (o aceptor final de elétrons não é o O_2). Uma importante aplicação dos processos anaeróbicos é no tratamento de efluentes industriais. O lodo, matéria orgânica no estado sólido, produzido nas estações de tratamento de esgoto deve ser adequadamente disposto no ambiente, diminuindo os impactos na natureza, e uma alternativa ao tratamento do lodo é o processo de digestão anaeróbia que se baseia na decomposição biológica utilizando microrganismos, em anaerobiose, para a degradação de matéria orgânica. Os produtos finais desse processo são o dióxido de carbono, a amônia e o metano, sendo este último utilizado como fonte alternativa de geração de energia. Uma vantagem desse processo comparado com o aeróbio é a sua baixa produção de lodo biológico.

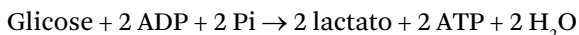
2.4 Reações catabólicas para obtenção de energia

A maioria dos microrganismos oxida carboidratos como fonte primária de energia celular, porque essas biomoléculas as mais abundantes na natureza e a glicose é mais importante delas utilizada como fonte de energia pelas células. Os microrganismos degradam a glicose em dois processos distintos para permitir que a energia seja captada em forma aproveitáveis, que são a respiração celular e a fermentação.

Geralmente, tanto a respiração celular quanto a fermentação iniciam-se pela glicólise, seguindo, posteriormente, vias diferentes. A glicólise é a oxidação da glicose em ácido pirúvico com produção de ATP e NADH. A partir do ácido pirúvico a célula poderá seguir a via da respiração ou da fermentação. Na respiração, de modo geral, ocorrem mais duas etapas após a glicólise, que são o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, enquanto na fermentação, o ácido pirúvico e os elétrons transportados pelo NADH na glicólise

são incorporados nos produtos finais da fermentação, que incluem álcool (etanol) e ácido lático.

2.4.1 Glicólise

Geralmente, a glicólise é a primeira etapa no catabolismo dos carboidratos, sendo essa via utilizada pela maioria dos microrganismos. A glicólise é também chamada de via de Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) e é uma via que acontece em uma sequência de reações enzimáticas.

Cada molécula de glicose é oxidada em duas moléculas de piruvato, contendo cada uma 3 átomos de carbono e a energia liberada é conservada na forma de duas moléculas de ATP, pela fosforilação ao nível do substrato, e na forma de NADH (redução do NAD+).

A glicólise pode ser dividida em dois estágios:

No estágio primário (ou etapa preparatória) a glicose é fosforilada por dois ATP e convertida em duas moléculas de gliceraldeído–3–fosfato.

No segundo estágio (ou etapa de conservação de energia) as duas moléculas de gliceraldeído–3–fosfato são oxidadas por duas moléculas de NAD+ e fosforiladas em reação que emprega o fosfato inorgânico, formando quatro ATP, até formar duas moléculas de ácido pirúvico. A equação geral da glicólise é:

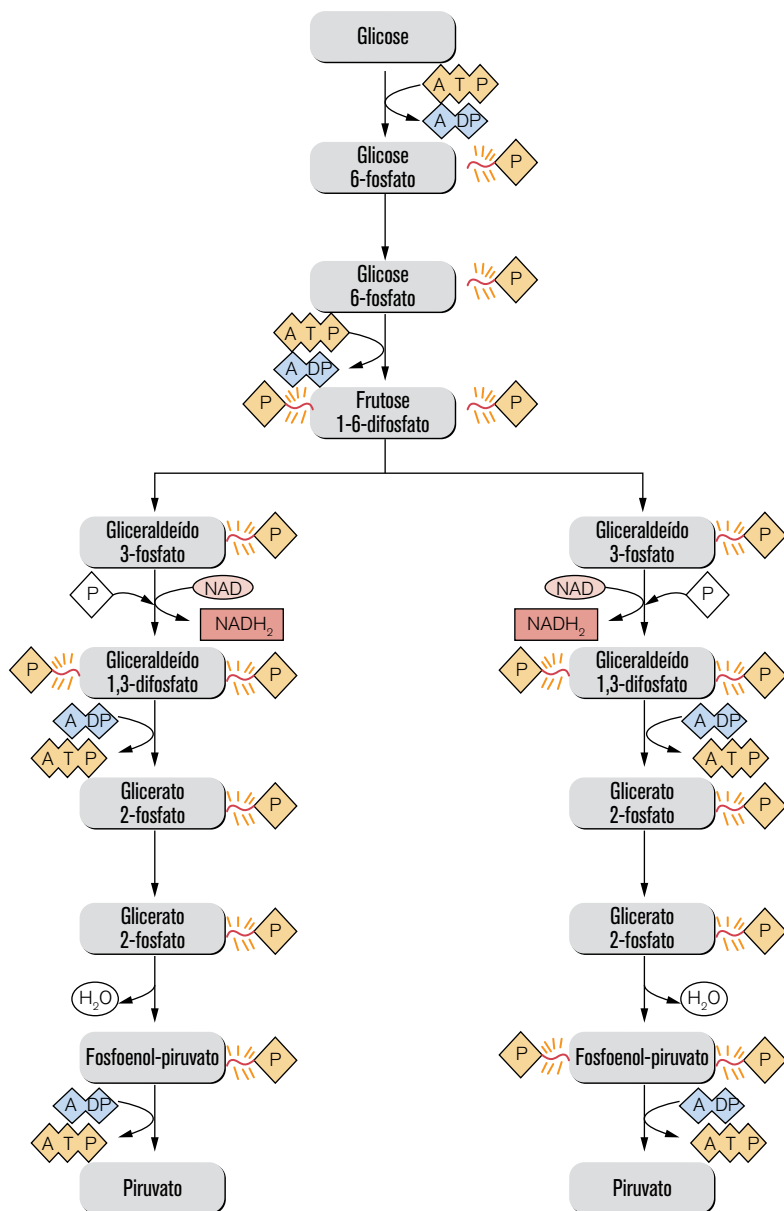
$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} + 2\ \text{NAD}^+ \rightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^+ + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{H}_2\text{O}$$

A glicólise pode ocorrer tanto na presença quando na ausência de O_2. Em condições de baixo suprimento de oxigênio (hipóxia) ou em células sem mitocôndrias, o produto final da glicólise é o lactato e não o piruvato, em um processo denominado glicólise anaeróbica:

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \rightarrow 2\ \text{lactato} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{H}_2\text{O}$$

Muitas bactérias possuem vias alternativas à glicólise para oxidar a glicose. As mais comuns são:

- Via da pentose fosfato;
- Via Entner-Doudoroff.

Figura 2.3 – https://alimentacaosaudavel.files.wordpress.com/2009/04/glicolise-12.jpg

2.4.2 A Via Pentose Fosfato

Essa via também chamada de desvio hexose–monofosfato ou via oxidativa do fosfogliconato acontece simultaneamente à glicólise; não requer e não produz ATP; e é realizada em condições anaeróbias.

Seus principais produtos são o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotído fosfato reduzido), que é um agente redutor empregado para os processos anabólicos, e a Ribose–5–fosfato, componente estrutural de nucleotídeos e de ácidos nucléicos. Característica importante dessa via é a produção de importantes pentoses intermediárias utilizada na síntese de ácidos nucléicos; glicose a partir de dióxido de carbono na fotossíntese; e certos aminoácidos. As bactérias que utilizam a via pentose fosfato incluem: Bacillus subtilis, E. coli, Leuconostoc mesenteroides e Enterococcus faecales.

2.4.3 A Via Entner-doudoroff

Essa via utiliza enzimas diferentes daquelas presentes na glicólise, podendo as bactérias que as possuem, metabolizar glicose sem a glicólise ou a via pentose fosfato. O piruvato é formado diretamente na via Entner-doudoroff. Portanto, assim como as bactérias lácticas, os organismos que utilizam a via Entner-doudoroff utilizam uma variante da via glicolítica. Essa via gera apenas metade do ATP gerado pela via glicolítica. A via Entner-doudoroff é exclusiva de algumas baterias gram-negativas, como Rhizobium, Pseudomonas e Agrobacteruim.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=2wih8fPG7Ik

2.5 Reações anabólicas para formação de macromoléculas

Microrganismos podem sintetizar aminoácidos direta ou indiretamente a partir de intermediários do ciclo de Krebs, outros necessitam que o ambiente forneça alguns aminoácidos pré-formados. Na síntese de aminoácidos um grupo amina é adicionado ao ácido pirúvico, num processo chamado de aminação, quando o grupo amina provém de um aminoácido preexistente, é chamado de transaminação. A maioria dos aminoácidos formados é destinada à síntese de proteínas, que são essenciais como enzimas, componentes estruturais e toxinas, dentre outros papéis.

2.5.1 Biossíntese de Purinas e Pirimidinas

Aminoácidos, como ácido aspártico, glicina e glutamina, sintetizadas a partir de intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs são utilizados para a produção de purinas e pirimidinas, que são constituintes dos nucleotídeos.

2.5.2 Vias intermediárias ou anfibólicas

As vias anabólicas e catabólicas não acontecem separadas nas células, sendo integradas por um grupo de intermediários comuns e também dividindo certas vias metabólicas, como o ciclo de Krebs. Essas vias que unem anabolismos e catabolismo são chamadas de vias intermediárias ou anfibólicas, e permitem que um composto usado em uma reação de degradação seja usado em outra de síntese, e vice-versa.

2.6 Diversidade metabólica microbiana

A classificação das estratégias metabólicas dos microrganismos inclui termos para as fontes de carbono, para as fontes de energia e para as fontes de elétrons. Em relação às fontes de carbono, os microrganismos podem ser **autotróficos**, se utilizam moléculas inorgânicas, ou **heterotróficas**, se utilizam moléculas orgânicas.

Em relação às fontes de energia, podem ser **quimiotróficos**, se obtêm energia a partir das reações de **oxirredução** dos compostos químicos – orgânicos ou inorgânicos – ou **fototróficos**, se utilizam a luz como fonte de energia.

Em relação às fontes de elétrons, podem ser **litotróficos**, se obtêm elétrons a partir de compostos inorgânicos e **organotróficos**, se obtêm elétrons a partir de compostos orgânicos.

2.7 Princípios de Biologia Molecular Microbiana

A aplicação da biologia molecular em microbiologia é muito vasta, passando pela área da sistemática microbiana com base molecular, pelo estudo da evolução dos microrganismos e também pela sua aplicação na biotecnologia através da engenharia genética, que permite ao homem a produção de várias substâncias úteis, em que a insulina e antibióticos são bons exemplos.

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade e, muitos deles são ainda desconhecidos do homem. Mas como surgiu toda essa diversidade? Atualmente é claro que uma tão grande variedade das características morfológicas, fisiológicas e ecológicas dos diversos grupos de microrganismos é controlada pela sua constituição genética dos organismos em interação com o ambiente do qual fazem parte. Esta diversidade microbiana surge como o resultado da evolução: mutações e recombinação genética que ocorrem nos microrganismos que são capazes de viver em vários habitat. Quando um novo habitat surge, fica sujeito à colonização quer pelos organismos pré-existentes quer por novos microrganismos que tenham surgido por mutação genética. Os microrganismos mais aptos para crescer e proliferar e, ainda, competir com os outros de forma vantajosa estabelecem-se nesse novo habitat. Assim, o ambiente está constantemente a selecionar os indivíduos mais adaptados. A grande variedade físico-química dos habitat existentes na Terra permite a grande diversidade de microrganismos atualmente conhecidos.

Com o conhecimento atual é possível escolher a composição genética das células com o objetivo de produzir novas substâncias. Este processo é chamado de engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante. Os pesquisadores podem combinar desta forma características únicas de células tão diferentes

como uma célula bacteriana e uma célula humana. Assim, com estas técnicas, microrganismos foram transformados para a produção industrial de várias substâncias como a hormônio do crescimento, o agente anticancerígeno interferon, vacinas, etc...

Os avanços científicos que tornaram possível a engenharia genética têm grandes implicações para o futuro de cientistas e das pessoas em geral. Pela introdução de genes em microrganismos é possível desenvolver variedades de micro-organismos que apresentam soluções para problemas tão diversos como a poluição, a falta de alimento ou de energia, e ainda para o controlo de doenças. Pelo fato dos cientistas poderem agora produzir novos e microrganismos, únicos e extremamente úteis, uma nova indústria se desenvolve com base na engenharia genética - a Biotecnologia.

https://www.youtube.com/watch?v=OEtRVt3Kl3k

2.7.1 Visão geral sobre genes

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=4R4Q1dcxQVI

Os ácidos nucleicos são macromoléculas que contém a informação para a determinação da sequência de aminoácidos e, portanto, da estrutura e função de todas as proteínas de uma célula. O ácido desoxirribonucleico (DNA) contém todas as informações necessárias para construir as células e tecidos de um organismo. A réplica exata desta informação em qualquer espécie garante a sua continuidade genética de geração em geração e é crítico para o desenvolvimento normal de um indivíduo. A informação armazenada no DNA é arranjado em unidades hereditárias, agora conhecido como genes, que controlam características identificáveis de um organismo. No processo de transcrição, a informação

armazenada no DNA é copiada para o ácido ribonucleico (RNA), que tem três papéis distintos na síntese de uma proteína.

O RNA mensageiro (RNAm) transporta toda a informação de DNA que especifica a ordem correta dos aminoácidos durante a síntese de proteínas. Neste processo, as informações do RNAm é interpretada por um segundo tipo de RNA o RNA tranportador (RNAt) com o auxílio de um terceiro tipo de RNA, o RNA ribossomal (RNAr), e suas proteínas associadas. A ordem correta de aminoácidos é montada em sequência pelo RNAt, ligados por ligações peptídicas para compor as proteínas.

Descoberta da estrutura do DNA em 1953 e a posterior elucidação de como este dirige a síntese de RNA, que, em seguida, dirige-montagem de proteínas do chamado dogma central, foram realizações monumentais que marcam o início da Biologia Molecular. No entanto, a representação simplificada do dogma central como DNA-RNA-Proteina não reflete o papel das proteínas na síntese de ácidos nucleicos. Além disso, as proteínas são junto de outros componentes, responsáveis pela regulação da expressão gênica, processo pelo qual a informação codificada no DNA é descodificada para a síntese das proteínas que caracterizam vários tipos de células.

2.7.2 A estrutura e função do DNA

Os biólogos na década de 1940 tinham dificuldade em aceitar o DNA como o material genético por causa da simplicidade aparente de sua química. O DNA era conhecido por ser um longo polímero composto por apenas quatro tipos de subunidades, que se assemelham entre si quimicamente. No início dos anos 1950, o DNA foi analisado em primeiro lugar por meio de análise de difração de raios-x, uma técnica para a determinação da estrutura atômica tridimensional de uma molécula. Os resultados de difração de raios-X iniciais indicaram que o DNA era composto de duas cadeias do polímero numa dupla hélice. A observação de que o DNA de cadeia dupla foi de fundamental importância e uma das principais pistas que conduziram à estrutura de DNA de Watson&Crick. Somente quando este modelo foi proposto o potencial do DNA para a replicação e informações de codificação se tornou claras.

Uma molécula de DNA que consiste de duas longas cadeias polinucleotídicas constituídas por quatro tipos de subunidades de nucleotídeos. As ligações de hidrogênio entre as porções de base dos nucleotídeos mantem as duas

cadeias em conjunto. Os nucleotídeos são compostos de um açúcar de cinco carbonos ao qual estão ligados um ou mais grupos de fosfato e uma base contendo nitrogênio. No caso dos nucleotídeos no DNA, o açúcar desoxirribose está ligado a um grupo fosfato simples (daí o nome de ácido desoxirribonucleico), e a base pode ser adenina (A), citosina (C), guanina (G), ou timina (T). Os nucleotídeos estão covalentemente ligados entre si através de uma cadeia de açúcar e de fosfatos. Uma vez que apenas difere da base em cada um dos quatro tipos de subunidades, cada cadeia de polinucleótido no DNA é análoga a um colar (espinha dorsal) enfiado com quatro tipos de grânulos (os quatro bases A, C, G e T). Estes mesmos símbolos (A, C, G, e T) são também vulgarmente utilizados para designar os quatro nucleotídeos diferentes, isto é, as bases com os seus grupos de açúcar e fosfato ligados.

A forma na qual as subunidades de nucleotídeos estão alinhados em conjunto numa cadeia de DNA dá uma polaridade química. Pensando em cada açúcar como um bloco com um botão saliente (o fosfato 5') de um lado e um furo (a hidroxila 3'), por outro, cada cadeia completa, formado pelo encaixe com furos puxadores, terão todas as suas subunidades alinhada com a mesma orientação.

Além disso, as duas extremidades da cadeia será facilmente distinguíveis, como um tem um buraco (a hidroxila 3') e o outro um botão (o fosfato 5') no seu terminal. Esta polaridade de uma cadeia de DNA é indicada por referência a uma extremidade como a extremidade 3 e a outra como fim 5'.

A estrutura tridimensional da dupla hélice de DNA decorre da características estruturais das suas duas cadeias polinucleotídicas e química. Uma vez que estas duas cadeias são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre as bases sobre as diferentes vertentes, todas as bases estão no interior da dupla hélice, e os esqueletos de açúcar-fosfato são do lado de fora. Em cada caso, uma base de dois anéis mais volumosa (a purina) é combinada com uma base de anel simples (uma pirimidina). A sempre faz par com T e G com C. Este emparelhamento de bases complementares permite que os pares de bases para ser embalado no arranjo energeticamente mais favorável no interior da dupla hélice. Neste arranjo, cada par de bases é de tamanho semelhante, mantendo assim a estrutura açúcar-fosfato numa distância igual entre si ao longo da molécula de DNA. Para maximizar a eficiência do empacotamento de pares de bases, o açúcar-fosfato forma em torno de si para uma dupla hélice, com uma volta completa a cada dez pares de bases.

Cada par de bases pode se encaixar dentro da dupla hélice se as duas cadeias da hélice são antiparalelo, ou seja, apenas se a polaridade de uma cadeia

é orientada oposta ao da outra cadeia. Uma consequência destes requisitos de emparelhamento de bases é que cada cadeia de uma molécula de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência de nucleotídeos do seu parceiro de cadeia.

2.7.3 A estrutura do DNA fornece um mecanismo para Hereditariedade

Genes transportam informação biológica que deve ser copiada com precisão para a transmissão para a próxima geração de cada vez que uma célula se divide para formar duas células filhas. Duas questões biológicas centrais surgem a partir desses requisitos: como pode a informação para especificar um organismo ser realizadas sob a forma química, e como ele é copiado com precisão? A descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA foi um marco em biologia do século XX, pois imediatamente sugeriram respostas para ambas as perguntas, resolvendo, assim, ao nível molecular o problema da hereditariedade.

DNA codifica a informação através da ordem, ou sequencia, dos nucleotídeos ao longo de cada vertente. Cada base de A, C, T ou G pode ser considerada como uma letra de um alfabeto de quatro letras que explicita as mensagens biológicas na estrutura química do DNA. O conjunto completo de informações no DNA de um organismo é chamado de **genoma**, e carrega as informações de todas as proteínas que o organismo vai sintetizar. A quantidade de informação contida nos genomas é surpreendente: por exemplo, uma célula humana típica contém 2 metros de DNA.

Escrito com quatro letras do alfabeto de nucleotídeos, a sequência de nucleotídeos de um gene humano muito pequeno ocupa um quarto de uma página, enquanto que a sequência completa de nucleotídeos no genoma humano iria encher mais do que mil livros e carrega as instruções para formar cerca de 30.000 proteínas.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=zl0eppS8QH0

2.7.4 DNA replicação, reparo e recombinação.

A capacidade das células para manter um elevado grau de ordem num universo caótico depende da duplicação exata de grandes quantidades de informação genética realizada sob a forma química de DNA. Este processo, chamado de replicação de DNA, tem de ocorrer antes de uma célula pode produzir duas células filhas geneticamente idênticos. Manter a ordem também requer a vigilância contínua e reparação desta informação genética, porque o DNA no interior das células é repetidamente danificado por produtos químicos e radiação do ambiente, assim como por acidentes térmicos e moléculas reativas.

Embora a sobrevivência em curto prazo de uma célula pode depender de evitar alterações no seu DNA, a sobrevivência em longo prazo de uma espécie exige que as sequências de DNA poder ser alterados ao longo de muitas gerações. Apesar dos grandes esforços que as células fazem para proteger o seu DNA, alterações pontuais nas sequências de DNA ocorrem. Ao longo do tempo, essas mudanças fornecer a variação genética em que pressões de seleção agir durante a evolução dos organismos.

2.7.5 Replicação do DNA

Todos os organismos devem duplicar o seu DNA com extrema precisão e em altas taxas (até mil nucleotídeos por segundo), antes de cada divisão celular. O DNA que existe na natureza pode se apresentar de diversas formas, tais como: fitas simples e duplas, e os dois podem existir tanto na forma linear como na circular. Como muitos DNAs se apresentam como dupla hélice pode-se apresentar algumas das características gerais da replicação que se aplicam para DNA lineares e circulares. Descreveremos o processo de replicação em procariontes e, mais especificamente, em Escherichia coli, organismo no qual ele foi mais bem estudado.

Todas as vezes que uma célula se divide para produzir células filhas, o DNA precisa se duplicar ou replicar dando origem a uma nova molécula de DNA com a mesma sequência de bases existente na original, assegurando, assim, que as funções que executam serão perpetuadas na sua descendência.

A replicação do DNA envolve a separação das duas fitas parentais e a produção de duas novas fitas, tendo as parentais como molde. Cada nova molécula de

DNA contém uma fita parental e uma fita recém-sintetizada, caracterizando a replicação semiconservativa.

O processo de replicação é complexo e envolve a participação de várias proteínas e enzimas que atuam de forma coordenada para garantir uma fidelidade considerável.

As regiões de fita simples são estabilizadas pelas proteínas de ligação de fita simples (SSB) que protegem essas regiões de sofrer hidrólise pelas nucleases. De modo a aliviar a tensão provocada pela torção da cadeia dupla durante o seu desenrolar pela helicase, a enzima DNA topoisomerase I se associa com a cadeia parental a montante da helicase. Esta enzima cataliza quebras transitórias das ligações fosfodiéster em um dos filamentos fornecendo um eixo de rotação que permite que os segmentos de DNA em lados opostos da quebra girem independentemente, com o filamento intacto servindo como eixo. As topoisomerases I são extremamente eficientes pois armazenam a energia resultante da clivagem das ligações fosfodiéster para serem reaproveitadas para recompor o filamento.

Já foram descritas 5 DNA polimerases de E. coli, as DNA polimerases II, IV e V não são necessárias para a replicação e estão envolvidas em mecanismos de reparo de danos ao DNA.

As DNA polimerases catalisam a adição de nucleotídeos ao filamento em crescimento da extremidade 5' para a 3'. No terminal 5' do açúcar há um grupo fosfato e no 3' existe uma hidroxila livre onde se estabelece a ligação fosfodiéster com o nucleotídeo que esta sendo incorporado.

Observou-se que as DNA polimerases não são capazes de catalizar a síntese desde o início, elas necessitam de um pequeno filamento de nucleotídeos, um oligonucleotídeo iniciador, ao qual ela adiciona os nucleotídeos seguintes. Esse oligonucleotídeo iniciador é de RNA, copiado de forma complementar à fita molde de DNA pela RNA primase. As DNA polimerases, para realizarem o processo de polimerização, necessitam também dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dTTP, dATP, dGTP e dCTP) e de Mg^{2+}.

A DNA polimerase III é um complexo enzimático com 10 subunidades responsável pela polimerização 5' → 3' da fita de DNA recém-formada. Esta holoenzima apresenta, ainda, a atividade 3' → 5' exonucleásica que permite que nucleotídeos incorretos adicionados sejam prontamente removidos, um por vez, durante a replicação e substituídos por nucleotídeos corretos, mecanismo de revisão e reparo.

A DNA polimerase I tem a função de reparar e remendar o DNA danificado e para tanto apresenta as atividades; polimerásica 5' → 3' e exonucleásica 3' → 5' e 5' → 3', esta última permite que vários nucleotídeos sejam removidos durante o reparo.

Durante o processo de replicação do DNA, uma das fitas novas é formada continuamente na direção 5' → 3' (fita líder) e a outra de maneira descontínua e no sentido inverso para manter a mesma direção 5' → 3' (fita retardatária). A fita descontínua é replicada através de fragmentos de Okasaki (1000 a 2000 nucleotídeos). Cada um desses fragmentos apresenta, além do DNA recém sintetizado, um RNA iniciador que será substituído por desoxirribonucleotídeos pela DNA polimerase I e a DNA ligase reconstituirá a nova fita. O filamento líder possui apenas um RNA iniciador que também será substituído pela DNA polimerase I.

A replicação do DNA se inicia em um ponto específico da dupla hélice denominado de origem de replicação e prossegue em direções opostas gerando a formação de duas forquilhas de replicação. A medida que a replicação avança as forquilhas se distanciam e ocorre a formação de uma bolha de replicação. No DNA circular dos procariontes existe apenas uma origem de replicação e se forma uma única bolha enquanto que nos eucariontes existem várias origens de replicação e, portanto, se formam várias bolhas. A única origem de replicação presente em E. coli, chamada de OriC, apresenta 245 nucleotídeos e contem duas sequências diferentes repetidas conservadas, uma delas é rica em A:T o que facilita a separação dos filamentos e a outra possui sítios de ligação para uma proteína importante para a formação da bolha de replicação.

A compreensão do mecanismo de replicação em eucariontes não é tão extensa em razão de sua maior complexidade. Embora muitos princípios sejam os mesmos, a replicação eucariótica é mais complicada em três aspectos básicos: existem várias origens de replicação, o tempo deve ser controlado de acordo com o tempo de divisão celular e há mais proteínas e enzimas envolvidas.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=pin3569Qfgl

2.7.6 Síntese e processamento do RNA

Embora a maioria dos genes codifique proteínas, os produtos finais de alguns genes são moléculas de RNA. Várias destas moléculas de RNA têm papéis essenciais na síntese de proteínas. Uma vez que os genes controlam as estruturas dos RNAs e das proteínas, nos questionamos como as sequências de pares de nucleotídeos nas moléculas de DNA especificam as sequências de nucleotídeos no RNA e aminoácidos em moléculas proteicas.

A transcrição é a síntese de uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) complementar a um filamento molde de ácido desoxirribonucleico (DNA). Os RNAs produzidos nas células procarióticas e eucarióticas são moléculas de uma única fita composta de nucleotídeos de adenina, guanina, citosina e uracila unida por ligações fosfodiéster que apresentam estruturas secundárias, incluindo regiões de dupla fita intramoleculares que são importantes para suas funções. As enzimas responsáveis pela síntese dos RNAs são denominadas de RNA polimerases.

Todos os RNAs são sintetizados na direção 5' para 3' e todas as RNA polimerases são capazes de iniciar a síntese de RNA. Nas células procarióticas existe apenas um tipo de RNA polimerase e a mais estudada é a de E. coli que é composta de duas subunidades α, uma subunidade β e outra β', que interagem entre si para formar um complexo. Quando o fator σ (sigma) se junta ao complexo, a polimerase ganha especificidade e é capaz de se ligar aos sítios corretos de iniciação no DNA e começar a transcrição. As células eucarióticas possuem três RNA polimerases: I (sintetiza os RNAr), II (sintetizam os RNAm) e a III (sintetizam pequenos RNAs incluindo os RNAt).

As três classes de moléculas de RNA são encontradas em células procarióticas e eucarióticas: RNA ribossômico (RNAr), RNA de transferência (RNAt) e RNA mensageiro (RNAm).

Os RNAm representam a classe mais heterogênea de RNAs encontrada nas células, variando em tamanho de 500 a mais de 6000 nucleotídeos, eles carregam a informação genética, definindo a sequência de todas as proteínas da célula. Após a sua síntese, as extremidades dos RNAm eucarióticos são modificadas de maneira específica. Todos os RNAm eucarióticos possuem um "cap" de nucleotídeo guanina metilada na sua extremidade 5', unido por uma ligação trifosfato 5'- 5'. Na extremidade 3' ocorre a adição de vários (30-100) resíduos de timina formando uma cauda de poli A.

Nos eucariontes os RNAm são sintetizados como grandes precursores, composto de éxons (sequências codificadoras) e íntrons (sequências intervenientes ou não codificadoras) que precisam ser processados (splicing) antes de se tornarem funcionais. Esse processamento normalmente envolve a remoção dos íntrons e a ligação dos éxons. Atualmente, sabemos que os íntrons interrompem a maioria, mas não todos, os genes eucarióticos, raros genes de alguns vírus de procariontes e de uma arquibactéria, porém o seu significado biológico ainda é incerto.

Especula-se que eles possam regular a expressão de genes uma vez que a presença de grandes íntrons diminui a taxa de acúmulo de transcritos em uma célula. O fato de que os íntrons acumulam mutações novas muito mais rapidamente que os éxons indica que sua sequência de nucleotídeos não é muito importante. Especula-se que a estrutura éxon-íntron dos genes eucarióticos é resultado da evolução de novos genes através da fusão de genes ancestrais com um único éxon e se assim for os íntrons podem ser apenas vestígios do processo evolutivo. De maneira alternativa os íntrons podem conferir uma vantagem seletiva aumentando a taxa com a qual as sequências codificantes em éxons diferentes de um gene podem se reassociar por recombinação, acelerando assim o processo de evolução. Portanto, diferentes íntrons podem ter diferentes papéis e muitos íntrons podem não ter nenhum significado biológico. Como muitos genes eucarióticos não contém íntrons, acredita-se que essas regiões não sejam necessárias para a expressão gênica normal.

Os RNAt procarióticos e eucarióticos são semelhantes em tamanho e em estrutura. Eles apresentam estruturas secundárias, extensas e vários ribonucleotídeos modificados. Todos os RNAt se apresentam como uma estrutura dobrada com quatro alças distintas, denominada de trevo de quatro folhas, onde a alça do anticódon é a estrutura responsável pelo reconhecimento do códon complementar de uma molécula de RNAm. Outra estrutura proeminente encontrada em todas as moléculas de RNAt, é o eixo aceptor, formado pelo pareamento de bases encontradas no final de suas extremidade 5' e 3'. As três últimas bases encontradas no final da extremidade 3' se mantêm não pareadas e possuem sempre a mesma sequência: 5'-CCA- na qual se liga o aminoácido. Essas moléculas funcionam como adaptadores que levam os aminoácidos para o local de síntese de proteínas.

As moléculas de RNAr dos procariontes são de três tamanhos diferentes (16S, 23S e 5S) e a dos eucariontes são de quatro tipos (18S, 28S, 5,8S e 5S) que

realiza a síntese de proteínas. Os RNAr eucarióticos são sintetizados como um único transcrito com tamanho de 45 S que é processado em RNAr 28S, 18S, 5,8S e 5S. Os RNAs 28S, 5,8S e 5S se associam a proteínas ribossômicas para formar a subunidade maior do ribossomo e o RNAr 18S se associa com outras proteínas específicas para formar a subunidade menor do ribossomo e estas subunidades interagem para formar um ribossomo funcional.

O processo de transcrição dos RNAs pode ser dividido em três fases: iniciação, alongamento e terminação (Figura 13). Durante a iniciação ocorre a ligação de uma RNA polimerase a região no DNA que determina que aquele gene especificamente será transcrito, a região do promotor. As sequências do promotor reconhecidas pela RNA polimerase são: na posição -10 a Caixa de Pribnow e a sequência -35 (procariontes) e na posição -25 a Caixa de Hogness e a Caixa CAAT (eucariontes) (Figura 14). Durante o alongamento, a RNA polimerase começa a sintetizar um RNA complementar ao molde de DNA e o fator sigma é liberado. Quando um sinal de terminação é atingido ocorre à liberação do RNA e da enzima que poderá catalizar outros processos de transcrição. Alternativamente uma proteína adicional, o fator rô pode ser necessário para a liberação do RNA transcrito.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=9OPegOKIR8Y

2.7.7 Síntese de proteínas

A síntese de proteínas ou tradução corresponde à etapa final da transferência de informação genética, armazenada no DNA, para as moléculas de proteínas, que são os principais componentes estruturais e funcionais das células vivas. Durante a tradução essa informação, expressa em um RNA, é utilizada para comandar a síntese de uma proteína. O processo de tradução envolve três componentes principais: o RNA mensageiro (RNAm) que contém a informação necessária para direcionar a síntese de proteínas, o RNA de transferência (RNAt) que carregam os aminoácidos que serão incorporados à proteína e os ribossomos que reúnem o RNAm e o RNAt, de modo a permitir que o aminoácido correto

seja incorporado à proteína. A tradução começa próximo à extremidade 5', que corresponde ao terminal amino da proteína e prossegue em direção à extremidade 3' do RNA, que corresponde ao terminal carboxila da proteína.

A mensagem genética está contida em um código triplo, não sobreposto, sem vírgulas, degenerado e universal (Figura 15). Somente uma combinação das quatro bases existentes no RNA (A, T, C e U) três a três pode gerar o número de combinações ou códons (64) necessários para codificar cada um dos 20 aminoácidos que podem ocorrer nas proteínas. Nenhuma base é compartilhada entre códons consecutivos. O ribossomo move-se ao longo de três bases por vez e como não existe qualquer base interveniente entre os códons, o código é denominado sem vírgulas. O código é degenerado, porque mais de um códon podem codificar o mesmo aminoácido e universal, porque é o mesmo seja em bactérias ou no homem. Três códons (UAA, UAG e UGA) não especificam aminoácido e são utilizados como sinais para interromper a síntese de uma proteína. O códon AUG, que especifica somente a metionina, tem um duplo papel: ele codifica a metionina em qualquer lugar em que ele se encontre no RNA e também marca o início da síntese proteica.

A tradução é um processo dinâmico que envolve a interação de enzimas, RNAt, ribossomos e RNAm de maneiras específicas para produzir uma molécula de proteína capaz de desempenhar uma função celular específica. Esse processo é normalmente dividido em três etapas: iniciação, alongamento e terminação.

A iniciação da síntese de proteínas ocorre quando um ribossomo (ambas as subunidades) é acoplado ao RNAm e o sítio P é ocupado por uma molécula de metionina – RNAt. Este complexo é formado pela ação de proteínas conhecidas como fatores de iniciação. Em procariontes três fatores de iniciação (IF-1, IF-2 e IF-3) participam do processo e em eucariontes existem pelo menos 12 fatores de iniciação diferentes. O complexo de iniciação se forma justaposto à extremidade 5' da região codificadora do RNAm e a N-formil metionina (fmet) é o primeiro aminoácido incorporado em todas as proteínas bacterianas. A montagem do complexo de iniciação é dirigida pela hidrólise de GTP eo movimento deste complexo ao longo do RNAm é dirigido pela hidrólise de ATP.

O alongamento começa com a ligação de um RNAt, carregado com um aminoácido, ao sítio A do ribossomo. Em seguida, a peptidiltransferase cataliza a formação de uma ligação peptídica entre o aminoácido do sítio A e o aminoácido do final da cadeia peptídica crescente no sítio P. Participam deste processo

dois fatores de alongamento (Tu e FE-G) e ocorre a hidrólise de GTP. A cadeia peptídica está agora transitoriamente ligada ao sítio A. o ribossomo é então movido um códon abaixo no RNAm e a cadeia peptidíca nascente no sítio A se move para o sítio P. Todo o processo recomeça para a adição do próximo aminoácido. Esta fase é idêntica tanto em células procarióticas e eucarióticas mas os fatores de alongamento são diferentes.

A terminação da tradução se dá quando o sítio A do ribossomo atinge um dos códons de terminação do RNAm. Três fatores protéicos denominados de fatores de liberação (R1, R2 e R3) reconhecem estes e fazem com que a proteína que está unida à última molécula do RNAt, no sítio P, seja liberada. Este processo é uma reação dependente de energia obtida pela hidrólise de GTP. Após a liberação da proteína recém-sintetizada, as subunidades ribossômicas, o RNAt e o RNAm, se dissociam umas das outras.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=rD9sDfvOxy8

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=bNE8CyYF0q0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2011. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª Edição. Editora Artmed.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Editora Artmed.

FALCONE, Carolina Oliveira. **Avaliação de lípase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a parti r de resíduos oleosos do saneamento**. 2009. Disponível em: htt p://www.prh29.ufes.br/downloads/PGs%202009.1/PG_Carolina%20Falcone.pdf.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia médica**. 24 ed. Rio de Janeiro. Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. 2009.

KARP, G.. Cell Biology. 6th Edition. BIER, O. Fisiologia bacteriana. In: **Microbiologia e Imunologia**. 23.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1984. Cap.3, p.43-77, 2010.

MADIGAN, Michael T.; MARTNKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Editora: Artmed. São Paulo. 2010.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro. Edoti ra Elsevier. 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christi ne L. **Microbiologia**. 8 ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2009.

TRABULSI, ALTERTHUM. **Microbiologia**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

3

Genética Bacteriana

OBJETIVOS

- Conhecer a Genética Bacteriana;
- Aprender sobre Mutação e Recombinação;
- Estudar a Recombinação genética e os Principais mecanismos de regulação gênica.

3.1 Genética bacteriana

A Genética bacteriana, se comparado ao genoma eucarioto, o genoma bacteriano é relativamente pequeno e se encontra em contato direto com o citoplasma (ausência de carioteca). As informações genéticas das bactérias estão contidas em um único cromossomo. Outras informações também são encontradas em plasmídios, DNA frágil e transposons.

O cromossomo bacteriano é uma organela geralmente circular associada a proteínas, que quando se condensa, forma uma massa chamada de nucleóide, encontrando-se aderido à membrana celular em vários pontos. É composto por DNA de cadeia dupla e tem forma envelopada e compacta, por ter somente uma cópia de cada gene, as bactérias são geneticamente haplóides. A replicação é semiconservativa, os genes estão organizados em operons, não apresenta íntrons, tem alto conteúdo G + C e possui baixa frequência de sequências repetidas.

Pequenas quantidades de DNA extracromossomial também são encontradas nos procariotos na forma de plasmídio, uma estrutura circular e com genes que conferem propriedades especiais às células, como fator de resistência a antimicrobianos (Fator - R), fatores sexuais (Fator - F) e produção de enzimas e toxinas, mas não são essenciais para a sobrevivência da bactéria, embora possa proporcionar vantagens seletivas. Os plasmídios podem ser transferidos de uma bactéria para outra por conjugação e a maioria carrega de um a mais tipos. Eles são capazes de autoduplicação independente da replicação cromossômica.

Os transposons, também chamados de genes saltadores ou sequências de inserção, são pequenos segmentos lineares de DNA que podem se mover de uma posição para outra, cromossomo-plasmídio, plasmídio-cromossomo ou plasmídio-plasmídio, deixando cópias no sítio de inserção. Eles não se autoduplicam. O DNA frágil são vírus bacterianos basicamente constituídos de DNA envoltos por uma capa protéica. Esses bacteriófagos injetam seu material genético na célula bacteriana, a qual pode passar a transcrever essa nova informação se ela for inserida no genoma.

As bactérias podem apresentar variações genéticas que resultam em clones com propriedades distintas da linhagem “selvagem” original. A variabilidade genética se dá através de mutação ou recombinação.

3.1.1 Mutações

Mutações são alterações na sequencia de bases do DNA contidas no genoma de um organismo, produzindo uma linhagem mutante. Algumas vezes, essas alterações das bases de um gene causam mudanças na proteína codificada por ele, sendo uma fonte de variabilidade genética, permitindo o processo de adaptação. Elas podem ser detectadas por variações fenotípicas ou variações em processo bioquímico e biofísico.

De acordo o agente, as mutações podem ser espontâneas ou induzidas. As mutações espontâneas ocorrem devido a erros durante a replicação do DNA ou pela exposição à radiação ou agentes químicos, sendo raras de acontecer, com frequência de $1x10^9$ a $1x10^{12}$ por geração para cada gene. As induzidas são geradas pela exposição do organismo à ação de agentes genotóxicos. As mutações podem ser neutras, desvantajosas, letais e até mesmo benéficas.

Quando as mutações se tornam estáveis, elas podem ser passadas de uma geração para outra. E entre as principais variações fenotípicas resultantes dessas alterações, são conhecidas linhagens de mutantes auxotróficas (incapazes de sintetizar um ou mais fatores de crescimento – as linhagens selvagens são prototróficas), resistentes a drogas (diferenças na tolerância a drogas), morfológicas (incapacidade de produzir flagelo, pili, cápsula, ou variações na forma), temperatura-sensíveis (incapazes de produzir um metabólito ou uma função a temperaturas à normal) e supressor-sensível (incapaz de funcionar, a menos que ocorra outra mutação ou fator, ou outro supressor esteja presente).

3.1.2 Recombinação

A recombinação genética é a troca de material genético entre duas células, formando novas combinações gênicas, por um conjunto de processo que produzem rearranjos entre genes ou parte desses. Ela contribui para a diversidade genética da população, mas é um evento raro e não é parte essencial do ciclo de vida dos organismos procariotros. Os mecanismos evolutivos que permitem a recombinação são: transformação, transdução e conjugação.

1. Transformação

Processo pelo qual o DNA livre no meio liberado de uma célula doadora é incorporado por uma célula receptora, podendo está apresentar alterações

genéticas. A célula bacteriana para receber o DNA, deve estar no estado de competência, apresentando alterações fisiológicas que tornam a membrana celular permeável a moléculas grandes de DNA. Apenas algumas linhagens são competentes, indicando que essa capacidade seja determinada geneticamente. Somente os fragmentos de DNA de fita simples são incorporados ao genoma por recombinação.

Na integração do DNA transformante ao genoma bacteriano, o fragmento se liga à superfície celular através de uma proteína de ligação. Após a captação, o DNA se liga a uma proteína específica de competência e permanece ligada a ela até chegar ao cromossomo. Na replicação desses DNA heteroduplex, são formados duas moléculas de DNA, uma parental e outra recombinante. Durante a divisão celular, o DNA recombinante estará na célula transformada, que será geneticamente diferente da célula parental. Estas células transformadas são chamadas de recombinantes ou híbridas.

2. Transdução

Processo pelo qual o DNA bacteriano poderá ser transferido de uma célula a outra através da ação de um vírus. Após a penetração do DNA do fago, inicia-se o processo de replicação viral, quando proteínas são sintetizadas e o cromossomo bacteriano é destituído. Eventualmente, fragmentos de DNA são empacotados dentro do capsídio do fago no processo de montagem da partícula. A célula doadora sofre lise e libera partículas virais contendo o DNA bacteriano, até que estas infectem outras células e ocorra a recombinação, gerando genótipos diferentes nas células receptoras.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=HyrKRW4N-Dw

3. Conjugação

Processo de transferência de genes envolvendo o contato entre duas células. Esse mecanismo é codificado por plasmídios, mas pode haver a transferência de outros elementos genéticos. A célula doadora possui o plasmídio, designada de célula “macho”, e a receptora, denominada de “fêmea”, não possui esse elemento.

A transferência do plasmídio ocorre em quatro etapas. A primeira é a formação de uma união específica doador-receptor (contato efetivo) através de pili sexual presente na célula doadora que se liga à célula receptora por um receptor presente nesta. Após esse pareamento, ocorre uma retração do pili, aproximando as células. A segunda é a preparação para transferência do DNA, chamada de mobilização, que começa quando uma proteína corta o DNA no sítio de transferência e inicia uma replicação do tipo círculo rolante, que é a terceira etapa, a de transferência do DNA. A síntese de DNA acontece nas duas células, na doadora, para repor a fita transferida, e na receptora, para duplicar o DNA recebido. A última etapa é a formação de um plasmídio funcional replicativo na célula receptora, que se torna doadora.

Esse processo tem grande importância ecológica, dada a sua natureza infecciosa. Já houve muitos problemas nos tratamentos de doenças infecciosas devido a fenótipos de resistência a drogas decorrente a presença de plasmídios conjugativos em populações de células bacterianas.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=dhhTZXtwfL4

4. Transposição

A transposição é o processo pelo qual genes ao longo do cromossomo bacteriano saltam de um local para outro do genoma, sendo um evento raro. Esse mecanismo é realizado por elementos genéticos, chamados de elementos de transposição, que são as sequências de inserção, os transposons e alguns vírus especiais. Os dois primeiros elementos possuem um gene que codifica uma trasnposase, que catalisa a clivagem e remontagem do DNA, e pequenas repetições terminais invertidas nas extremidades do DNA que se inserem devido essas extremidades serem contínuas.

As sequências de inserção são elementos mais simples, carreando apenas informações genéticas para a sua inserção em novos locais. Os transposons são maiores que as sequências de inserção e também possuem outros

genes, que com frequência incluem marcadores de resistência a drogas. Há também os transposons conjugativos, que possuem genes que permitem sua mobilização para outro sítio e permite sua transferência de uma bactéria para outra.

Além dos genes de resistência e a capacidade de se transportarem para plasmídios conjugativos, os transposons podem ter outros elementos, os integrons, que capturam e expressam genes de outras fontes. Estes possuem um gene que catalisam a integrase, catalizando outro tipo de recombinação sítio-específica. O integron também contém uma sequência de DNA específica, a integrase integra cassetes gênicos, uma estrutura formada por um gene de resistência a antibiótico e uma pequena região para recombinação, a um promotor. Mais de 40 diferentes genes de resistência a antibióticos e outros genes relacionados à virulência foram identificados nos cassetes.

Os mecanismos de transposição conhecidos são o conservativo e o replicativo.

Na transposição conservativa, não há replicação, e o elemento transponível é apenas realocado de um local para outro, sendo que a quantidade de transposons sempre permanece a mesma. No caso dos transposons replicativos, eles se duplicam e inserem uma nova cópia em outro local, permanecendo o transposon original sempre no seu sítio de origem.

As bactérias podem possuir uma resistência inata a antibióticos. Organismos que não possuem um sítio de reação compatível com o antibiótico possuem uma membrana impermeável a drogas ou a genes que garantem resistência, por exemplo, modificando ou inativando a droga com uma enzima. A resistência também pode ser adquirida por uma população de bactérias através de uma mutação e seleção ou por troca de genes entre linhagens e espécies.

A resistência a drogas pode ser cromossômica ou plasmidial. A resistência cromossômica quase sempre dirigida a uma só droga, dependendo da ocorrência de mutações espontâneas, e a transferência de genes tem uma frequência relativamente baixa. Na plasmidial, pode ocorrer resistência múltipla, os plasmídios podem ser transferidos por conjugação e transferidos a outros gêneros e espécies.

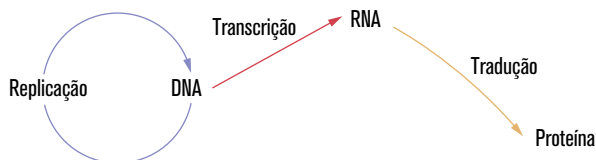
3.1.3 Controle da expressão gênica em procariotos

As necessidades de um microrganismo – como a bactéria ***Staphylococcus aureus***, por exemplo – são muito variadas e mudam constantemente. Para cada situação a bactéria precisa lançar mão de uma bateria de enzimas e proteínas que não estavam disponíveis momentos antes e que provavelmente não serão mais necessária minutos depois.

Como o organismo consegue ligar e desligar genes? A esse processo chamamos controle da expressão gênica.

Existem muitos tipos de RNA na célula: os mRNAs (RNAs mensageiros), os rRNAs (RNAs ribossomais) e os tRNAs (RNAs transportadores). Quando pensamos em expressão gênica, ou seja, na ativação de um gene para produzir uma molécula biologicamente ativa, não podemos nos esquecer dos RNAs, que participam do mecanismo de síntese protéica. Sua presença e funcionalidade influenciam diretamente a produção de uma proteína. Portanto, o termo expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteína. Teoricamente, a regulação em qualquer uma das etapas desse processo pode levar a uma expressão gênica diferencial dos genes que codificam proteínas e dos genes que codificam RNAs funcionais. A partir de um DNA molde até a produção de uma proteína funcional, existem vários pontos que podem influenciar a expressão gênica.

Figura 3.1

https://www.youtube.com/watch?v=kY8QCoGTBQw

3.1.4 Por que regular a expressão gênica?

Alguns produtos gênicos, como as moléculas de tRNA, rRNA, proteínas ribossomais, RNA polimerase e enzimas que participam de processos metabólicos essenciais, são chamados moléculas de "manutenção", pois são componentes essenciais de quase todas as células de qualquer organismo vivo. Os genes responsáveis pela produção dessas moléculas de "manutenção" são expressos continuamente e são, por isso, chamados genes constitutivos. Em contrapartida, a quantidade de genes em uma determinada célula, ou tipo celular, é muito maior do que o número de proteínas necessário para o funcionamento daquela célula. A expressão desnecessária de genes e a consequente produção de proteínas resultariam em um gasto energético muito grande. Então podemos concluir que é vantajoso regular a transcrição, modulando assim os níveis de RNAs que são produzidos em um determinado momento da vida daquela célula. Se pensarmos em termos evolutivos, a existência de um mecanismo de regulação provavelmente ofereceu aos organismos uma vantagem seletiva sobre os organismos que não o possuíam, e por isso muitos dos organismos – como bactérias ancestrais e vírus – apresentam mecanismos fantásticos e altamente elaborados de regulação da expressão de seus genes.

3.1.5 Como os procariotos regulam a expressão gênica?

Os procariotos sofrem com pequenas variações do meio ambiente, o que leva à necessidade de um ajuste no seu metabolismo que permita melhor adaptação às variações do meio externo. Surge então a primeira pergunta: "De que maneira algumas proteínas podem variar sua quantidade na célula em resposta ao meio no qual o organismo se encontra?". A regulação pode ocorrer durante a transcrição e a consequente produção do RNA e após a transcrição através do processamento. A estabilidade do transcrito influencia a síntese da proteína. Outro ponto de regulação ocorre durante a tradução (ou síntese proteica) e por modificações na proteína que estarão intimamente relacionadas à sua funcionalidade.

De modo geral, a regulação durante a transcrição é a mais comum de ocorrer, principalmente em procariotos. É fácil compreender o porquê disso:

energeticamente falando, é mais "barato" para a célula evitar que a transcrição ocorra quando a proteína não é necessária.

Existem dois tipos possíveis de regulação da transcrição; em ambos existe a participação de um gene regulador:

1. Controle positivo: o produto do gene regulador é necessário para ativar a expressão de um ou mais genes estruturais. Nesse caso, o produto do gene regulador é chamado ativador.
2. Controle negativo: o produto do gene regulador é necessário para desativar a expressão de genes estruturais. Aqui o produto do gene regulador é chamado repressor.

3.1.6 Regulação negativa e positiva

A expressão de um gene ou transcrição é iniciada quando a RNA polimerase se liga ao promotor em uma sequência específica. O produto do gene regulador (ativador ou repressor) se liga a uma sequência localizada próxima ao promotor. Algumas vezes, o produto do gene regulador não consegue se ligar sozinho ao gene e precisa de uma molécula efetora. As moléculas efetoras são pequenas moléculas, como aminoácidos, açúcares e outros metabólitos semelhantes. Quando participam em conjunto com um ativador, são chamadas moléculas indutoras (ou simplesmente indutores); quando participam em conjunto com um repressor, são chamadas moléculas co-repressoras (ou simplesmente co-repressores). O mecanismo de ação das moléculas efetoras (indutoras ou corepressoras) consiste na sua ligação ao produto do gene regulador, promovendo uma mudança na sua conformação, alterando sua capacidade de se ligar na região do DNA próxima ao promotor do gene que ele controla.

Durante a regulação negativa, o repressor está ligado ao operador na ausência da molécula efetora (co-repressor). A molécula efetora provoca a dissociação do repressor para permitir a transcrição. No outro caso, o repressor está ligado na presença da molécula efetora. Quando esta é removida, o repressor libera o operador e permite a transcrição. Na regulação positiva, o ativador se liga ao operador na ausência da molécula efetora (indutor), ativando a transcrição. Na presença desta, o ativador é desligado e para a transcrição.

No outro exemplo, o ativador está ligado na presença da molécula efetora. Quando esta é removida, o ativador é desligado e pára a transcrição. Com estes exemplos, você pode observar que existe mais de um tipo de regulação positiva e negativa.

Vamos utilizar alguns exemplos de regulação em Escherichia coli que utilizam um ou mais de um dos sistemas citados. As bactérias possuem um mecanismo geral para a regulação coordenada de genes que codificam produtos relacionados ao funcionamento de um determinado processo bioquímico, como a rota de biossíntese de aminoácidos. Os genes que codificam os produtos envolvidos nos diferentes passos de uma rota estão agrupados em uma região particular do cromossomo e geralmente são transcritos como uma única molécula de RNA. A maioria dos mRNAs de procariotos é policistrônica ou poligênica – um mesmo transcrito codifica mais de uma proteína. A produção do transcrito policistrônico é dirigida por um único promotor, o qual possui sequências que são responsáveis pela sua regulação. O conjunto formado pelos genes, pelo promotor e pelas sequências regulatórias recebe o nome Operon.

3.1.7 Regulação da atividade enzimática

Bactéria também tem maneiras de regular as atividades de suas enzimas.

Inibição por feedback (inibição por retroalimentação)

A atividade de enzimas bacterianas é frequentemente sujeita a inibição por feedback. Normalmente é o produto final de uma via que é o inibidor e a primeira enzima da via é a etapa que é regulada.

Modificação epigenética

As atividades de enzimas bacterianas podem também ser reguladas por modificações covalentes de enzimas. Tais modificações são chamadas de MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.

Ex. Adenilação da glutamina-sintetase; Fosforilação da glicogênio-sintetase

Normalmente essas modificações são reversíveis, de forma que as atividades das enzimas podem ser ligadas e desligadas.

3.1.7.1 Operon Lac

Em 1961, os pesquisadores François Jacob e Jacques Monod apresentaram pela primeira vez um modelo de regulação da transcrição em E. coli ao estudar o mecanismo de utilização da lactose como fonte de carbono por essa bactéria. Esse trabalho, de extrema importância para a compreensão das interações entre diferentes produtos gênicos, rendeu a eles o Prêmio Nobel de Medicina em 1965. Jacob e Monod propuseram que a transcrição de dois ou mais genes contíguos é regulada por dois elementos. Um desses elementos, o gene repressor, codifica uma proteína que em certas circunstâncias se liga a um segundo elemento, o operador. O operador está sempre próximo ao gene, ou aos genes, cuja expressão é regulada por ele. Na época em que os dois pesquisadores fizeram seus experimentos, a função dos promotores (que vimos anteriormente) ainda era desconhecida. Quando o repressor está ligado ao operador, ele inibe a atividade da RNA polimerase. Os operadores estão geralmente localizados entre o promotor e a região codificadora do gene. Surgiu, então, o conceito de Operon, sendo formado pelo promotor, operador e unidade transcricional.

O Operon Lac contém um promotor (P), um operador principal (O1), dois operadores secundários (O2 e O3) e três genes estruturais (lacZ, lacY e lacA) que codificam as enzimas β-galactosidase, permease e transacetilase. Além disso, apresentam o gene que codifica o repressor (gene I), que possui seu próprio promotor.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=iPQZXMKZEfw

O operador ao qual ele se liga mais fortemente (chamado O1) encontra-se ao lado do sítio de início da transcrição. O gene I é transcrito a partir do seu próprio promotor (P1) e é independente dos genes do Operon Lac. O Operon Lac possui, ainda, outros dois operadores secundários, aos quais se liga o repressor lac. O operador O2 está localizado próximo à posição +410 (dentro do gene que

codifica para a β-galactosidase). Já o operador O3 está localizado próximo à posição −90 (dentro do gene I, que codifica o repressor). O repressor Lac se liga ao operador principal O1 e a um dos operadores secundários (O2 ou O3). Como consequência, ocorre a formação de uma alça formada pelo DNA presente nos dois sítios de ligação. A formação da alça bloqueia o início da transcrição, pois "esconde" o promotor dos genes Z, Y e A.

Quando a lactose está disponível, o Operon Lac é induzido. Uma molécula indutora (sinal) se liga a um sítio específico do repressor Lac, causando uma mudança conformacional que leva à dissociação entre o repressor e o operador. O indutor do sistema do Operon Lac não é a própria lactose, mas sim um isômero da lactose chamado alolactose. Depois de entrar na célula, a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas de β-galactosidase existentes. A liberação do repressor Lac causada pela alolactose permite que os genes do Operon Lac sejam expressos e leva a um aumento de 1.000 vezes na concentração da β-galactosidase.

A enzima β-galactosidase é capaz de clivar a lactose em glicose e galactose, que servirão como fonte de carbono para a célula. É uma enzima induzível, uma vez que sua produção varia de acordo com as necessidades celulares. Sua expressão será alta, se a bactéria estiver crescendo em meio rico em lactose, e será baixa, caso exista outro carboidrato como fonte de carbono. Além de clivar a lactose em galactose e glicose, a β-galactosidase promove a formação de uma molécula chamada alolactose. Mais adiante voltaremos a falar sobre o papel dessa molécula na regulação do Operon Lac.

A galactosídeo permease é a proteína responsável pelo transporte de lactose do meio extracelular para o meio intracelular através da membrana bacteriana. A lactose, como a maioria dos carboidratos, não é capaz de atravessar a bicamada lipídica sem uma proteína carreadora. A função da transacetilase in vivo é incerta, mas in vitro é capaz de transferir uma acetila, do acetil-CoA, para a hidroxila do carbono seis de um tiogalactosídeo.

A ligação do repressor Lac reduz em cerca de 1.000 vezes a velocidade de iniciação da transcrição. Se os sítios O2 e O3 forem eliminados por deleção ou mutação, a ligação do repressor sítio O1 reduz a transcrição em cerca de 100 vezes. Apesar desse elaborado complexo de ligação, a repressão não é absoluta. Mesmo no estado reprimido, cada célula possui algumas moléculas de

β-galactosidase e da galactosídeo permease, presumivelmente sintetizadas nas raras ocasiões em que o repressor dissocia-se temporariamente dos operadores. Esse nível de transcrição basal é essencial para a regulação do Operon.

A lactose não é a principal fonte de carbono utilizada pela bactéria E. coli. No entanto, na falta de glicose, ela pode ser metabolizada. Para evitar desperdício de energia durante a produção das proteínas envolvidas no metabolismo da lactose, elas somente serão produzidas quando a lactose estiver presente no ambiente. Então, na ausência de lactose, existe uma proteína repressora chamada Lac que se liga ao operador do Operon e faz com que ele fique inativo. Na presença de lactose, a enzima β-galactosidase produz alolactose, que funciona como um agente indutor, uma vez que se liga ao repressor Lac e faz com que ele se desligue do operador. Pois bem, essa é uma das formas de regulação.

A segunda forma de regulação é modulada pela presença da glicose. A presença da glicose inibe a indução do Operon Lac, bem como de outros Operons que controlam a síntese de enzimas envolvidas com o catabolismo de carboidratos. Esse fenômeno, chamado repressão catabólica, assegura que, quando presente, a glicose será preferencialmente utilizada, em vez de outra fonte de carbono.

A repressão catabólica é mediada por uma proteína regulatória conhecida como CRP (do inglês cAMP receptor protein, que significa proteína receptora de cAMP) ou CAP (do inglês catabolite activator protein) e por uma molécula efetora pequena chamada cAMP (AMP cíclico – adenosina 3´, 5´- monofosfato). A proteína CRP é um homodímero (cada subunidade possui massa de 22kDa) que possui sítios de ligação para o DNA e o cAMP.

Sabe-se que o promotor Lac contém dois sítios de ligação separados, um deles para a ligação da RNA polimerase e outro para a ligação do complexo CRP-cAMP.

Resumindo a regulação do Operon Lac: na ausência de glicose e presença de lactose, o complexo CRP-cAMP se liga ao promotor, estimulando a transcrição, ao mesmo tempo que o repressor Lac será desligado do operador pela ação da alolactose. Na presença de glicose, o complexo CRP-cAMP não se forma e, consequentemente, não ocorre a transcrição. Mas para que a transcrição ocorra também é necessária a presença da lactose, que, através de seu derivado alolactose, irá deslocar o repressor Lac do operador. O complexo CRP-cAMP precisa

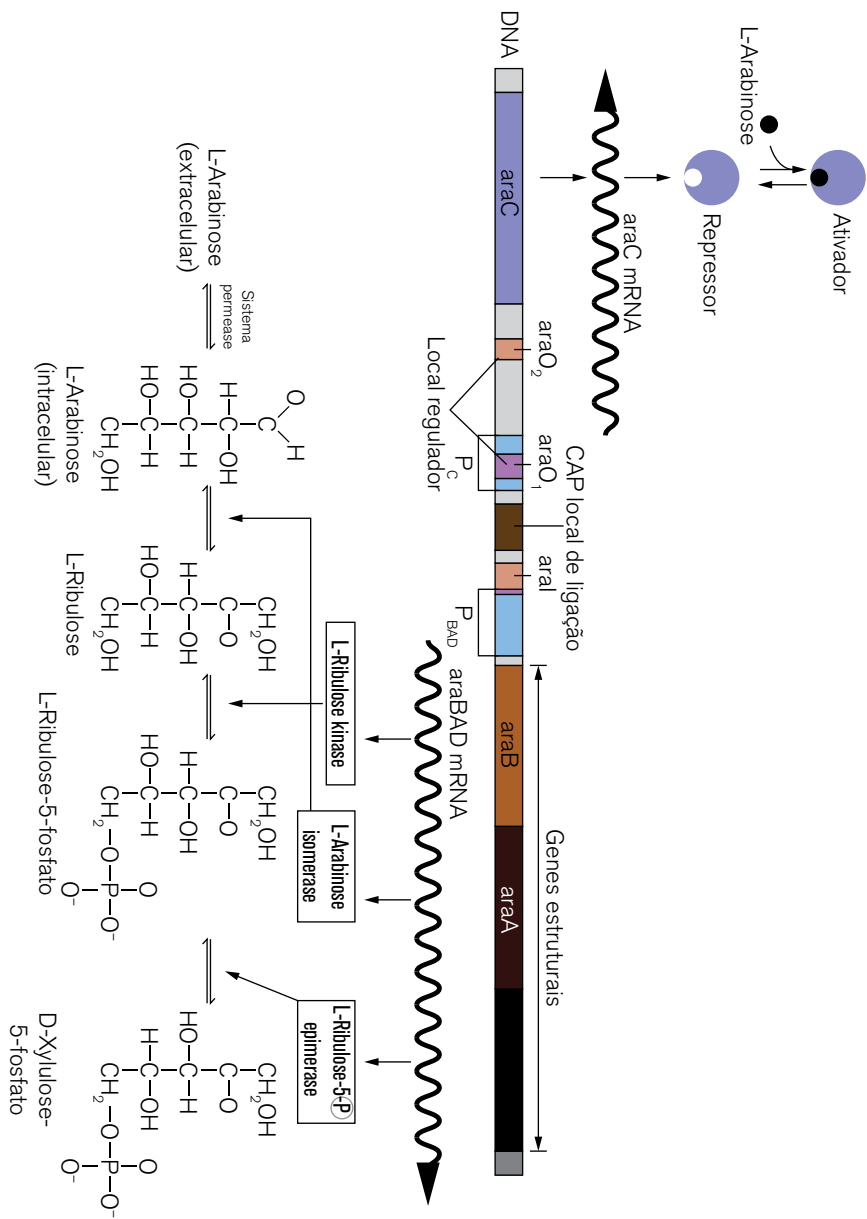
estar presente no seu sítio de ligação para que o promotor do Operon Lac seja ativado. O complexo exerce um controle positivo na transcrição do Operon Lac, oposto ao efeito observado para a proteína repressora. Somente o complexo se liga ao promotor. Na ausência de cAMP, a proteína CRP não se liga.

Não é intenção deste tópico, saturar este assunto, mas é importante que se saiba que a concentração intracelular de cAMP é sensível à presença de glicose. A glicose inibe a atividade da enzima adenilato-ciclase, responsável pela síntese de cAMP, de modo que, na presença de glicose, os níveis de cAMP serão baixos e com isso não haverá formação do complexo com a proteína CRP e a consequente ligação ao promotor, mantendo o Operon Lac inativo.

Desse modo, podemos concluir que, quando existir lactose e glicose, a glicose será utilizada primeiro, e a lactose só será utilizada quando os níveis de glicose baixarem e houver produção de cAMP. Em adição, a presença da lactose é necessária para produzir a alolactose, que é a molécula que permitirá o desligamento do repressor Lac do operador.

3.1.7.2 Operon ARA

Um esquema regulador mais complexo é encontrado no Operon arabinose (ara) de E. coli. A E. coli pode usar a arabinose como uma fonte de carbono, convertendo-a em xilulose-5-fosfato, um intermediário na via da pentose fosfato. Essa conversão requer as enzimas ribulose cinase, arabinose isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase codificadas pelos genes araB, araA e araD, respectivamente. Os três genes estão presentes no Operon Ara. Este Operon possui dois operadores (araO1 e araO2), o sítio araI (I de indutor), ao qual se liga a proteína reguladora AraC e um promotor adjacente ao araI, responsável pela transcrição dos genes araB, araA e araD (PBAD). O promotor araO2 possui um único sítio de ligação para a proteína AraC, enquanto araI e araO1 possuem dois sítios de ligação na mesma orientação. O gene araC está localizado próximo a essa região e é transcrito a partir do seu próprio promotor (PC), mas sua orientação é oposta aos genes araB, A e D. O sítio de ligação da CRP está localizado próximo ao promotor PBAD, que modula a sua ativação de forma diferente da que vimos para o Operon ARA (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Operon ARA. http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt27/957.jpg

No Operon Ara, a proteína reguladora AraC exerce um controle positivo e também um controle negativo. De que maneira isso é possível? Pois bem, a

proteína reguladora se liga a uma molécula sinal (arabinose) que promove uma mudança conformacional na sua estrutura, fazendo com que a proteína mude de uma forma repressora para uma forma ativadora da transcrição. Essa mudança tem consequências drásticas no seu efeito final. Além disso, a proteína repressora, AraC, regula sua própria síntese através da inibição da transcrição do próprio gene. Esse mecanismo é chamado autoregulação. Por último, os efeitos de algumas sequências reguladoras podem ser exercidos a distância, ou seja, essas sequências nem sempre estão localizadas próximas aos promotores. As sequências de DNA distantes podem ser aproximadas pela formação de uma alça de DNA. Essa aproximação ocorre através de interações específicas proteínaproteína e proteína-DNA.

O papel da proteína AraC na regulação do Operon Ara é complexo. Veja como isso funciona! Quando a concentração de AraC excede 40 cópias por célula, ela regula sua própria síntese, ligando-se ao araO1 e reprimindo a transcrição do gene araC. Ela age tanto como um regulador positivo quanto como regulador negativo dos genes araB, A e D, ligando-se tanto ao araO2 quanto ao araI. Quando ligada ao araO2, ela se liga simultaneamente ao araI e inibe a transcrição a partir do PBAD. Quando a arabinose está ausente, não é necessário expressar os genes estruturais que participam do seu metabolismo. A AraC se liga simultaneamente ao araO2 e ao araI e, como resultado, promove a formação de uma alça que compreende o DNA localizado entre os dois sítios. A formação da alça impede o acesso da RNA polimerase ao promotor.

Quando a arabinose está presente, ela se liga à proteína AraC e provoca uma alteração conformacional, que faz com que a AraC assuma sua função como ativadora da transcrição. AraC se liga ao araI, que funciona também como um sítio ativador. Se a glicose estiver ausente, ocorre a formação do complexo CRP-cAMP, o qual se ligará a seu sítio de ligação localizado entre o araO2 e o araI. Essa ligação faz com que a alça de DNA (formada pela proteína ligada ao araO2 e araI) se rompa e auxilia na ligação da AraC ao araI. Nesse caso, o complexo CRP-cAMP não exerce a função de auxiliar à ligação da RNA polimerase ao promotor.

Quando a arabinose e a glicose estão abundantes, ou ambas estão ausentes, o Operon Ara permanece reprimido. Todavia, não se sabe ao certo a situação em que se encontram as proteínas reguladoras e seus sítios de ligação nessas condições. A regulação do Operon Ara é rápida e reversível.

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=7qkb1q7NZ3U

3.1.7.3 Operon TRP

Os vinte aminoácidos-padrão são requeridos em grandes quantidades para a síntese de proteínas, e a E. coli é capaz de sintetizar todos eles. Os genes das enzimas necessárias para sintetizar um determinado aminoácido estão geralmente agrupados num Operon e são expressos todas as vezes que os suprimentos do aminoácido estão inadequados para atender às necessidades celulares. Quando o aminoácido estiver abundante, as enzimas biossintetizantes não são mais necessárias e o Operon é reprimido. O Operon triptofano (trp) (figura 2) da E. coli inclui cinco genes estruturais que codificam as três enzimas utilizadas na conversão de corismato em triptofano.

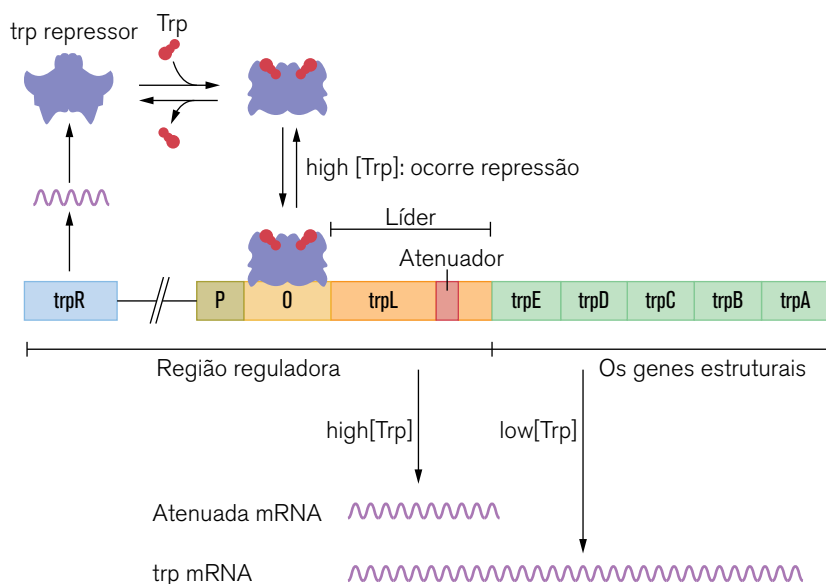



Figura 3.3 – Operon TRP. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/95/Trpoperon.svg/2000p

x-Trpoperon.svg.png

O gene trpE codifica o componente I da antranilato sintase, enquanto o componente II é produzido pelo gene trpD. O gene trpC codifica a N-(5´-fosforribosil antranilato isomerase/indol–3–glicerol fostato sintase. O gene trpB codifica a subunidade β da triptofano sintase, enquanto o gene trpA codifica a subunidade α. A expressão do Operon é regulada pela proteína repressora TrpR, que é produzida a partir do gene trpR. O gene trpR está localizado a uma longa distância do Operon. O repressor Trp é um homodímero, com cada subunidade contendo 107 resíduos de aminoácidos. Quando o triptofano for abundante, ele se liga ao repressor Trp, provocando uma alteração conformacional que permite ao repressor se ligar ao operador trp e inibir a expressão do Operon Trp. O sítio do operador trp se sobrepõe ao promotor, de forma que a ligação ao repressor pode bloquear a ligação da RNA polimerase. Novamente, esse circuito simples ligar/desligar mediado pelo repressor não conta toda a história regulatória. Um mecanismo muito mais intrigante foi descoberto no Operon Trp. Quando foi descoberta a regulação negativa do Operon Trp modulada pelos níveis de triptofano e sua ligação à TrpR, acreditava-se que um mutante para o gene trpR deveria ser insensível ao triptofano.

Imagine a surpresa quando descobriram que tal mutante continuava não expressando os genes estruturais após a adição de triptofano! A partir dessa observação, estabeleceu-se um segundo nível de controle pelo triptofano que envolvia dois componentes: o tRNA para o triptofano, tRNAtrp e o gene trpL.

O gene trpL codifica um peptídeo que possui 14 aminoácidos. Na sua sequência, ele contém dois códons para o triptofano e, dessa forma, serve como um “termômetro” que sinaliza o suprimento de trp na célula. Se o triptofano estiver abundante, o tRNAtrp carregado com triptofano também estará disponível e, com isso, o peptídeo será traduzido. Se o triptofano estiver ausente, a tradução pára no ponto em que os ribossomos encontram os códons trp.

Você deve estar se perguntando: “E daí? O que isso tem a ver com a transcrição do Operon?”

A resposta para essa pergunta foi dada a partir da observação de que o mRNA do trpL pode assumir diferentes conformações devido à presença de várias regiões complementares que podem formar estruturas do tipo grampo de cabelo. Uma das conformações é semelhante ao terminador da transcrição típico de bactérias e resulta do pareamento entre as regiões 3 e 4. Na outra

conformação, o terminador não é formado porque a região 3 está agora pareada com a região 2. Essas estruturas são chamadas respectivamente terminador e antiterminador.

O que leva à formação de uma ou de outra estrutura? Em procariotos, a transcrição e a tradução podem ocorrer simultaneamente, diferentemente dos eucariotos – como veremos na Aula 2 deste módulo. Então os ribossomos estão ligados ao mRNA e podem influenciar a formação dessas estruturas no RNA. Se houver triptofano, o ribossomo segue logo atrás da RNA polimerase até o ponto em que é interrompido por um códon de parada, localizado na região 2 do transcrito. Nessa situação, ocorre a formação da alça através do pareamento entre as regiões 3 e 4. Se não houver triptofano, o tRNAtrp não estará carregado com triptofano e o ribossomo ficará detido na região 1, esperando a chegada de um tRNA apropriado. Com isso, a região 2 está livre e pode se parear com a região 3. Essa estrutura não impede o avanço da RNA polimerase, e o transcrito dos genes estruturais é produzido normalmente.

A sequência regulatória 1 é crucial para o mecanismo sensível ao triptofano que determina se a sequência 3 pareia com a sequência 2 (permitindo que a transcrição continue) ou com a sequência 4 (transcrição atenuada).

CONEXÃO

https://www.youtube.com/watch?v=J65z1bKf88o

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUCE et al. **Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria Genetics**, Vol. 154, 985-997, March 2000.

GRIFFITHS, Anthony J.F.; GELBART, William M.; MILLER, Jeffrey H.; Lewontin, Richard C. **Modern Genetic Analysis**. Science, 283 (5407): 1544-1548. 1999. [Versão eletrônica].

MADIGAN, Michael T.; MARTNKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Editora: Artmed. São Paulo. 2010.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo. Editora: Atheneu. 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8 ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2009.

4

Histórico da Antibióticoterapia

OBJETIVOS

- Conhecer o Histórico da antibioticoterapia e identificar os Mecanismos de ação dos principais agentes antimicrobianos.
- Aprender sobre a Origem da resistência aos fármacos e os Mecanismos bioquímicos de resistência.

4.1 Histórico da antibióticoterapia

Alexander Fleming, bacteriologista, publicou em 1929, em Londres, um trabalho relatando as propriedades estudadas em meios de culturas de ***Staphylococcus aureus***, contaminadas por um fungo existente no ar, pertencente ao gênero ***Penicillium notatun*** inibindo o crescimento. A substância produzida pelo fungo, depois de isolado, foi denominada de penicilina reconhecida por Fleming, como de possível utilização nos tratamentos das infecções, descoberta esta, que não foi de imediato valorizado na sua extensão terapêutica, permanecendo como uma curiosidade. Em 1939 foi descoberta a tirotricina por Dubos, obtida a partir de ***Bacillus brevis***, isolados do solo, entretanto esta substância mostrou-se ser extremamente tóxica em uso sistêmico.

Tendo emprego clínico, e um grande desenvolvimento em 1940, com a redescoberta por Florey, Chain e colaboradores, dos trabalhos efetuados por Fleming, aprimorados os estudos, obtendo a penicilina amorfa em estado sólido, ainda que impura, demonstrava que a ação da droga tinha efeitos nos curativos em infecções de animais de laboratório e do homem.

Experiências realizadas por Waksman em 1942, com antibióticos, demonstravam que alguns vegetais superiores apresentavam devidos ao seu metabolismo, substâncias similares, denominadas fitoncidas. O uso clínico da penicilina deu-se durante a Segunda Guerra Mundial, e a sua importância então estabelecida, resultando no aparecimento da estreptomicina, em 1944 por Shatz e col. Em 1945, sendo os trabalhos pioneiros de Fleming, reconhecidos fazendo por merecer o prêmio Nobel de Medicina, com as descobertas de novos antibióticos, as doenças infecciosas sofreram radical transformação, permitindo o controle com mais segurança, razão pelo qual a antibioticoterapia se constitui em conquista médica , para se ter um conceito deste poder, do antibiótico, basta analisar os resultados obtidos em 1945 no Hospital Emílio Ribas, em São Paulo, quando o indice de mortalidade por infecções era de 14,1%, com uso de antibióticos em 1950, a mortalidade em 1962, caiu para 0,7.

A antibioticoterapia, que em nosso meio representa 30 a 40% do receituário médico, é hoje um dos ramos mais importantes da Farmacodinâmica, apesar dos problemas que ela envolve. Tendo uma relação completa dos antibióticos descobertos, com ou sem aplicação clínica, publicado nos boletins de informação do Centro Internacional de informações Sobre Antibióticos, localizado na cidade de Liege, na Bélgica.

O diagnóstico suspeito, a facilidade do uso, da compra, falta de controle farmacêutico, a medicina popular, as dificuldades para estabelecer-se a etiologia do processo infeccioso são fatores que levam a usos inigualados, surgindo cada vez mais agentes patogênicos ultra resistentes.

Segundo o conceito estabelecido por Waksman, em 1942, dava-se o nome de antibiótico às substâncias elaboradas por seres vivos, geralmente microscópicos, dotados de atividades antimicrobiana, atuando como tóxicos seletivos, em pequenas quantidades, presumindo quase sempre "atividade biológica", ao contrario de quimioterápico, que são produtos de síntese ou de natureza vegetal, utilizadas com várias finalidades terapêuticas, eventualmente como antimicrobiano. As madeiras de lei do Brasil também produzem substâncias antibióticas, a exemplo do que ocorre com o jacarandá (***Dalbergia nigra***), o "Pau-d'Arco" (***Tabelina sp***), a casuarina, o guarantã e outras . Florey e colaboradores resaltaram em 1949 que as plantas e seus produtos, foram utilizados no tratamento das infecções, em épocas muito remotas, mesmo antes das descobertas microbianas, atualmente tem despertado a atenção dos pesquisadores as possibilidades e investigações sobre o papel de tais substâncias naturais.

Os novos métodos, naturais e artificiais, para obtenção de medicamentos como atividade antimicrobiana, somados ao aperfeiçoamento dos processos antigos, tornam necessário a revisão do conceito primitivo de antibiótico,algumas destas substâncias puderam ser sintetizadas; verificou-se que outras possuíam ação antiblástica, passou-se também a utiliza-las com finalidades industriais, em conservação de alimentos e em desinfecção, em indústrias de fermentação, seu emprego nos meios de cultura, impedindo a contaminação bacteriana, permitindo progressos à virologia.

4.2 Origem dos Antibióticos

Os antibióticos eram inicialmente obtidos somente a partir de determinados microrganismos e em seguida de vegetais superiores. Posteriormente, com o conhecimento da sua estrutura química, alguns passaram a ser sintetizados em laboratórios, enquanto, outros foram obtidos derivados semissintéticos que podem apresentar propriedades diferentes da substância inicial.

Grande maioria dos antibióticos é originada de fungos pertencentes ao gênero ***-Penicillium-***, ***-Cephalosporium-*** e ***-Streptomyces-***, e de bactérias do

gênero ***-Bacillus-***. Os microrganismos são conservados em meios adequados e dependendo da constituição deste meio podem produzir substâncias diferentes, obtenção dos antibióticos é conseguida após várias fases bioindustriais, onde após incubação, inicia-se a fermentação em meios apropriados, o caldo fermentado é filtrado e o antibiótico separado, alguns deles em forma de sais, destacando-se a penicilina G, que é apresentada em forma de sal sódico ou potássio. No processo, várias outras substâncias são produzidas com propriedades antibióticas, porém com atividade bem menor que a droga principal ou apresentando efeitos tóxicos que impedem o seu uso.

Por outro lado, estas substâncias podem provocar manifestações de natureza alérgica quando presente, como impureza, na apresentação comercial do antibiótico. Estudos bioquímicos dos antibióticos naturais permitem o conhecimento de suas formulas estruturais e possibilitam a obtenção de alguns por síntese laboratorial, exemplo o cloranfenicol, estudo este mais recente. Há novas perspectivas no campo da antibioticoterapia com o desenvolvimento dos antibióticos semissintéticos, tais substâncias são obtidas por modificações estruturais do próprio antibiótico natural, seja por adição de diferentes radicais ao seu núcleo básico, o qual pode ser obtido por degradação da droga formada ou por interrupção do processo fermentativo.

Os antibióticos semissintéticos atualmente mais desenvolvidos são os derivados da penicilina, da cefalosporina e das tetraciclinas. As penicilinas semissintéticas são obtidas pela adição de diferentes radicais ao núcleo básico da penicilina G, que é o ácido 6-amino-penicilânico, com as cefalosporinas que resultam do ácido 7-amino-cefalosporânico. Já com as tetracilinas, os derivados semissintéticos são obtidos por modificações na tetraciclina natural ou na oxitetraciclina.

Os derivados semissintéticos podem apresentar propriedades bastante diferentes da substância natural. Assim a oxacilina, um dos derivados penicilânicos, apresenta maior resistência à ação do pH ácido e da penicilinase do que a penicilina G, a ampicilina, outra das penicilinas semissintéticas, tem boa atividade sobre vários bacilos Gram negativos, efeito não observável com a penicilina G. Com respeito às tetraciclinas sem-sintéticas, as modificações nas propriedades dizem respeito à absorção e concentração das drogas, não havendo diferenças importantes quanto à atividade antimicrobiana, em relação às tetraciclinas naturais.

4.2.1 Classificação Química

Segundo a estrutura química, os antibióticos são divididos em quatro grupos, de acordo com a constituição química tendo importância pelo fato das substâncias do mesmo grupo apresentar, em geral o mesmo mecanismo de ação e espectro de ação semelhante, assim os aminoglicosídeos agem de modo idêntico, tendo efeito bactericida; todas as penicilinas apresentam o mesmo mecanismo de ação, tendo efeito bactericida; os antibióticos poliênicos agem sobre fungos com efeito fungicida; as tetraciclinas e rifocinas agem na síntese proteica; os macrolídeos têm o mesmo efeito bacteriostático, as que fogem a esta regra são as polimixinas , que têm mecanismo de ação diferente da bacitracina e vancomicina.

Derivados de Aminoácidos

a) Derivados monopeptídicos - cicloserina.

b) Derivados poliptídicos -polimixinas,tirotricina, bacitracina, vancomicina.

c) Derivados do aminopropanodiol -tianfenicol, cloranfenicol.

d) Derivados do ácido 6-amino-penicilânico-penicilinas.

e) Derivados do ácido 7-amino-cefalosporânico, cefalosporinas.

Derivados de Açucares

a) Heterosídeos macrolídicos-espiramicina, eritromicina, pristinamicina, oleandomicina.

b) Aminoglicosídeos-gentamicina,neomicina, canamicina, estreptomicina, paromomicina, gabromicima, soframicina.

c) Outro heterosídeos- novobiocina, lincomicina.

Derivados de acetatos

a) Poliênicos - nistatina, anfotericina B.

b) Aromáticos - tetraciclinas, rifocinas.

c) Outros- Griseofulvina e Fosfomicina.

A importância no agrupamento dos antibióticos segundo a constituição química refere-se a que, em alguns grupos, existe resistência cruzada entre os seus constituintes, fato ocorre entre os macrolídeos; as tetraciclinas; as

cefalosporinas; o cloanfenicol e tianfenicol. Em relação a outros antibióticos, isto não ocorre, porque as substâncias de um mesmo grupo podem apresentar determinados radicais na fórmula estrutural que modificam o ponto de ação do mecanismo de resistência bacteriana, principalmente quando de natureza enzimática. Pode-se citar a penicilina G e a oxacilina, frente ao estafilococo produtor de penicilinase. Este agente é resistente à ação da penicilina G porque a enzima por ele produzida age sobre o anel beta-lactâmico, transformando a penicilina no ácido peniciloico, desprovido de ação antimicrobiana, enquanto a oxacilina apresenta ação bactericida sobre o mesmo germe porque a penicilinase não é capaz de romper o anel, neste caso protegido por um radical mais complexo e ligado mais solidamente.

O conhecimento da resistência cruzada entre antibióticos é de importância para que se evite a terapêutica de duas drogas do mesmo grupo ou a substituição, em caso de resistência, de um antibiótico por outro que sofrerá o mesmo mecanismo de resistência; no caso de ocorrer resistência à sulfadiazina não adianta sbstituí-la por outra sulfa, ainda que de eliminação lenta, mesmo fato ocorrerá entre as tetraciclinas, onde a resistência a uma delas representa, geralmente, resistência a todo grupo.

Outra consequência do conhecimento da sensibilidade ou resistência dos agentes antibióticos de um mesmo grupo está na avaliação de fidedignidade de um antibiograma, neste, a sensibildade mostrada para o cloranfenicol deve se a mesma para o tianfenicol; idem ocorre entre os macrolídeos; as tetraciclinas; as cefalosporinas; as polimixinas.

AGENTES PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS:	
ANTIBIÓTICO	MICRORGANISMO PRODUTOR
Ampicilina -	*Penicillium notatum, chysogenum*
Anfotericina -	*Streptomyces nodosus*
Bacitracina -	*Bacillus subtilis*
Canamicina *	*Streptomyces kanamyceticus*
Cefalosporinas -.	*Cephalosporium sp*
Cloranfenicol *	*Streptomyces venezuelae*
Clortetraciclina *	*Streptomyces aureofaciens*
Colistina -	*Bacillus polymyxa*
Eritromicina *	*Streptomyces erythreus*
Estreptomicina *	*Streptomyces griseus*
Framicetina *	*Streptomyces lavendulae*
Gentamicina *	Micromonospora purpurea
Griseofulvina *	Penicillium griseofulvum

AGENTES PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS:	
ANTIBIÓTICO	MICRORGANISMO PRODUTOR
Lincomicina *	*Streptomyces lincolnensis*
Neomicina *	*Streptomyces fradiae*
Nistatina -	*Streptomyces noursei*
Novobiocina -	*Streptomyces niveus, spheroides*
Oleandomicina *	*Streptomyces antibioticus*
Polimixina B -	*Bacillus polymyxa*
Tirotricina -	*Bacillus brevis*
Vancomicina -	*Streptomyces orientalis*

Tabela 4.1

- Inibidores da síntese da parede celular ou de ação lesiva sobre a membrana celular.

* Inibidores da síntese protéica, com/sem bloqueio da formação de ácidos nucléicos.

4.2.2 Classificação segundo o espectro de ação

Os agentes infecciosos sobre os quais atuam os antibióticos são as bactérias, protozoários e fungos, sendo que as bactérias dividem-se em sete grupos, sendo; bactérias Gram negativas, Gram positivas, Riquétsias, Microbactérias, Micoplasmas, Espiroquetas e Bedsônias (antigo grupo dos "grandes virus").

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com a ação predominante sobre cada um destes grupos:

a) Ativos sobre protozoários - paromomicina, gabromicina, cabimicina, tetraciclina, anfotericina B.

b) Ativos sobre fungos - nistatina, anfotericina B, griseofulvina

c) Ativos sobre bactérias Gram positivas - penicilinas, macrolídeos, bacitracina.

d) Ativos sobre bactérias Gram negativas - polimixinas, aminoglicosídeos.

e) Ativos sobre bactérias Gam positivas e Gram (amplo espectro) - cloranfenicol, tetraciclinas, ampicilina, betacilina, cefalosporinas, rifampicina.

f) Ativos sobre Micobactérias - estreptomicina, rifampicina, cicloserina, canamicina.

g) Ativos sobre Riquétsias, Micoplasmas e Bedsônias - tetraciclinas, cloranfenicol.

h) Ativos sobre Espiroquetas - penicilinas, eritromicina, tetraciclinas, cefalosporinas.

Esta classificação é bastante artificial, pois verifica-se antibióticos ativos em varias classificações, sendo que estes não são de "largo espectro" , e estes nem sempre se mostram eficazes, tendo o seu efeito limitado, devido a resistência bacteriana.

Com base em estudos "in vitro" também é possível determinar-se as menores concentrações de um antibiótico capazes de, ou impedirem o crescimento, (concentração inibitória mínima = CIM), ou causarem a morte do agente infeccioso considerado. Terapeuticamente considera-se a CIM como a capacidade de indicar se o agente antimicrobiano é ou não eficaz, ligando o seu valor com a concentração atingida no sangue, tecidos, ou onde se localiza o antibiótico devem avaliar-se as condições do organismo, na possibilidade de se modificar ou dificultar a atuação prevista.

4.2.3 Classificação segundo seu mecanismo.

4.2.3.1 Antibióticos que Interferem na Síntese da Parede Celular:

– Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina.

Antibióticos que interferem na função da membrana citoplasmática:

– Anfotericina B, nistatina, polimixinas.

Antibióticos que interferem na síntese dos ácidos nucléicos:

– Rifamicinas, griseofulvina.

4.2.3.2 Antibióticos que Interferem na Síntese das Proteínas :

a) Inibindo a síntese protéica:

– Cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, clindamicina.

b) Determinando síntese de proteínas anômalas:

– Aminoglicosídeos:

– Neomicina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, amicacina, sisomicina, tobramicina.

4.2.3.3 Parede celular, ação do antibiótico:

As células bacterianas são dotadas de envoltório semi-rígido, denominado parede celular, responsável pela conservação da forma do microrganismo; sem

a parede celular, a bactéria - dotada de elevada pressão osmótica interna - não conseguiria manter sua arquitetura. Em meio isotônico, inibindo-se a formação da parede celular, as bactérias adquirem forma esférica, passando a receber o nome de esferoplastos, protoplastos ou formas L. Em meio hipotônico - provido de frágil membrana citoplasmática - o protoplasto "explode".

A parede celular possui diversos componentes: sua "camada basal" é constituída por muco peptideo, um polímero complexo de características variáveis segundo a espécie considerada, da estrutura da parede celular, esse muco peptídeo da parede celular bacteriana tem como componentes dois amino-açúcares (ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina) e quatro peptídeos (1-alanina, ácido d-glutâmico, 1-lisina ou ácido diaminopimélico). Os amino-açucares alternam-se na formação de múltiplas cadeias lineares, sendo os quatro peptídeos ligados ao ácido N-acetilmurâmico. Essas cadeias são solidárias entre si através de pontes cruzadas, responsável, por conseguinte pela estrutura supermolecular do muco peptídeo esse enlace cruzado, conhecido como transpeptitação, estabelece-se com a participação enzimática da transpeptidase. A síntese da parede celular efetiva-se em quatro estágios distintos, de início, os precursores da parede celular (amino-açúcares e peptídeos) são sintetizados e agrupados no citoplasma; a seguir, esses fragmentos do muco peptídeo atravessam a membrana citoplasmática às custas de mecanismo transportador de natureza lipídica; depois, já no exterior, estes precursores sofrem polimerização, formando cadeias lineares; finalmente, por transpeptidação, configura-se a estrutura final do muco peptídeo.

4.2.3.4 Mecanismo de ação:

– A formação da parede celular pode ser inibida por qualquer antibiótico que seja capaz de interferir na síntese do muco peptídeo. Como decorrência segue-se formação insuficiente de parede celular, ruptura e morte.

4.2.3.5 Antibióticos que interferem na função da membrana citoplasmática:

– Anfotericina B, nistatina, polimixinas.

4.2.3.6 Antibióticos que interferem na síntese dos ácidos nucléicos:

– Rifamicinas, griseofulvina.

4.2.3.7 Antibióticos que interferem na síntese das proteínas:

a) Inibindo a síntese protéica:

– Cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, clindamicina.

b) Determinando síntese de proteínas anômalas:

– Aminoglicosídeos:

– Neomicina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, amicacina, sisomicina, tobramicina.

Os antibióticos, anfotericina B e da nistatina, atuam contra grande variedade de fungos e dá-se através de sua conjugação com esteroides existentes na membrana citoplasmática dos microrganismos sensíveis. Modifica-se como consequência, a permeabilidade dessa membrana, ocorrendo a saída do interior da célula de íons potássio e açúcares, sendo mais eficaz por inibição do crescimento. O fato de a membrana citoplasmática bacteriana não possuir esteroides em sua estrutura explica a toxicidade seletiva desses antibióticos; para que a anfotericina B e a nistatina atuem efetivamente, exige-se a presença de esteroide na constituição da membrana do microrganismo, este fato permite também explicar alguns efeitos adversos desses antibióticos.

As polimixinas ligam-se à membrana citoplasmática das bactérias sensíveis, determinando alterações funcionais desta estrutura, segue-se a perda do conteúdo celular e morte da bactéria. As polimixinas atuam como detergente, com afinidade por radicais fosfato existentes na membrana citoplasmática.

4.2.3.8 Antibióticos que interferem na Síntese de Ácidos Nucléicos.

Os ácidos ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) -são macromoléculas de cuja constituição participam um açúcar (ribose ou desoxirribose) e quarto péptides (adenina, guanina, timina ou uracil e citosina). Da união de

uma molécula de açúcar com uma das moléculas dos peptídeos tem origem um nucleotídeo:ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo.

A molécula de DNA contém milhões de desoxirribonucleotídeos, dispostos em sequência de quatro em quatro, sendo encontrada exclusivamente no núcleo celular. A molécula de RNA contém, dependendo de sua função, de 70 a 3000 ribonucleotídeos e é encontrada tanto no núcleo como no citoplasma celular.

A informação genética, necessária para a vida da célula, é mantida pelo DNA, sendo todo o patrimônio genético conservado e preservado em cada divisão celular. Uma enzima, a DNA polimerase, permite seja produzida uma réplica da molécula de DNA, dando origem a uma cópia da precedente (replicação da informação genética).

As duas cópias de DNA separam-se e, a partir da molécula filha, sob ação de RNA polimerase, têm origem moléculas de RNA de três espécies:

RNAr - RNA-ribosômico
RNAm - RNA-mensageiro
RNAt – RNA transportador

Os RNAm dispõem-se em fila e contêm a informação para a biossíntese de proteínas,na forma de uma sequência de tripé de nucleotídeos, sendo responsável cada tripé (códon) pela codificação para um aminoácido particular.

Os RNAr associam-se com partes iguais de proteína para constituir os ribossomos, partículas intracitoplasmáticas esféricas de que participam duas frações, uma 30 S e outra 50 S, os quais se separam por ultracentrifugação. Os ribossomos são visíveis à microscopia óptica, tendo um diâmetro de aproximadamente 200 A.

Os RNAt fixam-se especialmente aos aminoácidos e estes se transformam em amino-ácidos ativados; apresentam também, como os RNAm, uma sequência complementar de tripé de nucleotídeos (anticódon), que codifica para um aminoácido particular.

Para efetivar-se a síntese de proteínas, tudo se passa segundo uma "programação". Os ribossomos fixam-se sobre os RNAm, a que se ligam pela unidade 30 S; a partir desse momento o ribossomo se transforma numa máquina programada para fabricação de proteínas.

Os RNAt, responsáveis pelo transporte dos aminoácidos colocam-se em posição sobre o ribossomo por intermédio da complementação "codon-anticodon", os aminoácidos, então, são liberados ao nivel da subunidade 50 S,

exatamente no endereço preciso fixado por esse código (tradução da informação genética).

Na síntese da proteína, o ribosomo move-se ao longo do rRNA-mensageiro, fazendo uma leitura do código; aminoácidos ativados são, nessa oportunidade, posto em posição pelo RNAt e, à medida que o ribossomo percorre cada tripé de RNAm, outro aminoácido é adicionado à cadeia peptídica crescente.

4.2.3.9 Mecanismo de ação:

Os antibióticos desse grupo inibem a síntese de DNA ou de RNA, ou de ambos, simultaneamente, vários antibióticos antineo-plásticos possuem esse mecanismo de ação, atuando como antimicrobianos, a exemplo de:

Rifamicinas

Constituem um grupo de antibióticos com estrutura complexa; interferem com a RNA-polimerase, isto é, no fenômeno de transcrição da informação genética. A RNA polimerase das bactérias sensíveis forma complexos estáveis com as rifamicinas, sendo a inibição da atividade enzimática proporcional à quantidade de complexo formado. Em presença de bactérias resistentes esses complexos não são formados, deixado, portanto de ocorrer inibição enzimática.

Griseofulvina

A griseofulvina bloqueia a síntese de DNA dos microrganismos sensíveis, representados por várias espécies de fungos, sendo, porém desconhecido o local exato onde ocorre esse bloqueio. Sua relação estrutural com os nucleotídeos purínicos sugere, no entanto, que esse antibiótico possa inibir a síntese de DNA ao nível da participação das purinas.

4.2.3.10 Antibióticos que inibem a síntese de proteínas.

Como decorrência da inibição da síntese proteica os microrganismo deixam de crescer e tornam-se incapazes de multiplicar-se. Esses antibióticos são bacteriostáticos.

Cloranfenicol

Embora haja muitos estudos a esse respeito, o exato mecanismo de ação do cloranfenicol ainda não é conhecido; sabe-se com certeza que atua inibindo a

síntese proteica e que se fixa sobre ribossomos. A inibição da síntese protéica pode operar-se tanto em relação ao microrganismo como sobre o paciente que recebe a droga, tendo, entretanto diferenças quanto às características de toxicidade que se manifesta em um e em outro caso. Nas bactérias sensíveis, supõe-se que o cloranfenicol bloqueie a síntese de proteínas em níveis ribossômico, subunidades 50 S, depois da conjugação do RNAm e durante a condensação de aminoácido (que propiciam a formação de cadeias longas), induzindo a formação preferencial de dipeptídeos e tripeptídeos em vez de cadeias polipeptídicas.

Nas células dos mamíferos, considera-se que o cloranfenicol inibe a síntese de proteínas, bloqueando a união dos RNAm aos ribossomos ; o cloranfenicol não pode, pois, atuar sobre os ribossomos que já se tenham unido aos RNAm, indo manifestar sua atividade sobretudo nos tecidos de proliferação rápida, nos sistemas hematopoiético e linforeticular. A síntese de proteínas nas células eucarióticas não está confinada apenas aos ribossomos citoplasmáticos, as mitocôndrias são também capazes de efetivar a síntese de proteínas, o sistema ribossômico e o mitocondrial apresentam características fisioquímicas e funcionais diferentes.

Tetraciclinas

São muito numerosas as evidências que indicam que o modo de ação das tetraciclinas relaciona-se com a inibição da síntese de proteínas, parece que o momento mais importante dessa atividade refere-se à inibição da união do RNAt, já ligado ao aminoácido, com a subunidade 30 S do ribossomo; as tetraciclinas seriam inibidoras da interação "códon-anticódon".

Eritromicina e outros macrolídeos

A eritromicina e outros antibióticos do grupo dos macrolídeos atuam inibindo seletivamente a síntese proteica, estudos "in vitro" têm demonstrado que essa atividade se desenvolve por mecanismo de inibição da translocação do RNAt, já ligado ao aminoácido, do doador até o receptor, ou seja, do local onde têm origem os aminoácidos até o ribossomo.

Lincomicina e clindamicina

Esses atuam, ao que tudo indica, se ligado à subunidade 50 S do ribossomo, impedindo, a essa altura, a formação da ligação peptídica.

4.2.3.11 Antibióticos que atuam determinando a síntese de proteínas anômalas.

A formação de proteínas anômalas, por atuação de alguns antibióticos, acaba levando a um bloqueio do metabolismo celular; por esse motivo são bactericidas.

Aminoglicosídeos

São muito rigorosas as condições necessárias para que os códigos do RNAm e do RNAt se reconheçam. Os antibióticos aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina, paromomicina, gentamicina, amicacina, neomicina, tobramicina e sisomicina) fixam-se aos ribossomos ao nível da subunidade 30 S, provocando uma burla do código genético, com leitura incorreta, que induz à incorporação de um ou mais aminoácidos equivocados. Essas proteínas defeituosas exercem efeito letal para a célula ou, pelo menos, determinam para a célula, na ausência de proteína normal, uma deficiência de funções vitais.

Permeabilidade Reduzida

Resistência natural é encontrada em determinadas bactérias cuja parede celular tem a propriedade de não permitir a penetração do antibiótico, assim a droga não tem ação. Por determinarem a inibição da síntese da parede celular, favorecem a penetração dos aminoglicosídeos, o tornado apto a exercer sua atividade antimicrobiana. Resistência adquirida, pode ocorrer em determinadas bactérias que passam a apresentar, em certo momento, uma redução da permeabilidade a antibióticos definidos, (que esta em utilização).

Recursos para combater a resistência aos antibióticos

Com o decorrer do tempo, ocorre aumento progressivo do numero de bactérias resistentes, no processo infeccioso, com objetivo de impedir a progressão do aparecimento de cepas bacterianas resistentes, propõe-se a utilização de vários métodos:

a) Redução do consumo e aprimoramento na prescrição de antibióticos, exigência de prescrição para compra nas farmácias, fazendo-se a maior restrição possível ao uso de antibióticos de largo espectro, eliminação do uso de antibióticos como preservativos em rações de animais e em alimentos perecíveis, adoção de rodízio no emprego de antibiótico em hospitais.

b) Modificação na estrutura química dos antibióticos em uso, promovendo-se a substituição de ligações ou radicais passíveis de serem inativados ou destruídos por enzimas produzidas, pela bactéria resistente.

c) Intervenção nos mecanismos químicos da resistência, atuando no sentido de alterar-se a permeabilidade da célula bacteriana resistente (possibilidade apenas teórica).

d) Intervenção nos mecanismos genéticos de resistência, atuando-se de modo a eliminar os fatores R e os plasmídeos, método que também constitui apenas em teoria.

4.2.4 Características de um antibiótico.

Um antibiótico ideal deve preencher as seguintes condições:

a) Ter ação antimicrobiana seletiva e potente, sobre ampla série de microrganismos;

b) Exercer sua atividade antibacteriana em presença dos líquidos dos organismos, sem se destruir pelas enzimas;

c) Não perturbar as defesas do organismo;

d) Não lesar os leucócitos, nem lesar os tecidos do hospedeiro;

e) Não ter efeitos colaterais;

f) Baixo custo.

Quimioterapia antibacteriana

Paul Ehrlich introduziu o conceito de índice quimioterápico, relação entre a dose tolerada e a dose mínima curativa, o que propriamente caracteriza a quimioterapia é o emprego de substâncias dotadas de alto parasitotropismo e baixo organotropismo, portanto de índice quimioterápico elevado, procurando caracterizar as transformações da estrutura química que podem exercer influência quer sobre o organotropismo, quer sobre o parasitotropismo e estabeleceu desta maneira, as bases científicas da investigação quimioterápica, que tomou então incremento notável.

Os progressos realizados diziam respeito, tão somente ao tratamento das doenças causadas por espiroquetas e por protozoários. No que concerne às bactérias propriamente ditas, restringiam-se apenas às observações de Morgenroth & Levy (1911), que conseguiram proteger camundongos da

infecção pneumocócica com a optoquina, um azoderivado da hidroquinina (metil-hidrocupreína), cuja toxidez, sobretudo em relação ao aparelho visual (ambliopia), impediu o seu emprego terapêutico no homem.

Sulfanilamida e seus derivados

A sufamidocrisoidina, conhecida como, ***-Prontosil rubrum-***, era capaz de curar a infecção estreptocócica do camundongo e, quando aplicada à terapêutica humana, deu resultados positivos, sobretudo em infecções causadas por estreptococos hemolíticos.

As observações de Gerhard Domagk (1914), foram rapidamente confirmadas por outros pesquisadores, que mostraram que a sulfamidocrisoidina se desdobrava no organismo, pela ruptura da ponte de N = N, libertando um corpo mais simples, não-corado, ao qual se devia, na realidade, o efeito quimioterápico; a p-aminobenzeno-sulfanamida ou, simplesmente, sulfanilamida (amida do ácido sulfanílico). Com objetivo de se encontrarem preparações cada vez menos tóxicas e com uma margem de ação antibacteriana mais extensa surgiram os derivados N 1-substituindo-os em que a função amida se encontra ligada a um núcleo heterocíclico, tais como a sulfapiridina, sulfatiazol, sulfamerazina e sulfametazina.

Com o objetivo de se obter sulfas apropriadas à desinfecção do trato intestinal, procuraram-se compostos que apesar de solúveis na água, fossem escassamente absorvidos pelo intestino. A sulfaguanidina foi o primeiro destes derivados, seguido da sulfasuxidina e a sulfatalidina, a sulfabenzamina no tratamento local das feridas, largamente utilizada na 2ª Guerra Mundial. Característica deste composto é a de não sofrer antagonismo pelo ácido apraminobenzóico (PABA), ao contrario do que acontece com a sulfanilamida devido a ação competitiva $C_6H_4NH_2$, comum às sulfas e ao PABA, através da qual se dá a reação entre PABA e pteridina na síntese do ácido fólico.

A sulfanilamida, portadora da estrutura C6H4NH2, é capaz de inibir a formação do ácido pteróico, mas não a homossulfanilamida, na qual um grupamento CH_2 se interpõe entre o grupo amínico e o carbono 4.

Derivados sulfônicos e outros

No tratamento das infecções produzidas por bactérias bons resultados são obtidos com derivados sulfônicos, sais do ácido p-aminossalicílico (PAS) e a hidrazida do ácido isonicotínico. As sulfonas, propostas inicialmente como

tuberculostáticos, são hoje empregadas quase que exclusivamente no tratamento da lepra (dapsona, "Diasona" e "Promin"), o PAS e a isoniazida, em associação com a estreptomicina, integram o esquema tríplice no tratamento da tuberculose.

4.2.5 Sugestão de Aula prática

Avaliação "*in vitro*" da sensibilidade bacteriana a antibióticos - Antibiograma

Segundo os princípios gerais que regulamentam a indicação do uso de antimicrobianos e considerando-se a possibilidade de aquisição de resistência por parte dos microrganismos, a seleção adequada de um antibiótico para o tratamento de determinada doença infecciosa devem levar-se em consideração:

a) O conhecimento da sensibilidade do agente etiológico, "In vitro", ao antibiótico.

b) A suscetibilidade do microrganismo isolado em relação a outras cepas da mesma espécie.

c) As propriedades farmacológicas, incluindo distribuição, excreção, meia-vida, índice de ligação com proteínas plasmáticas e toxicidade, tanto em indivíduos normais quantos em pacientes com insuficiência renal ou insuficiência hepática.

d) A experiência clínica previamente acumulada sobre o emprego do antibiótico no tratamento da doença infecciosa em questão.

e) A natureza do processo patológico subjacente, e sua possibilidade de interferência no tratamento.

Dentre esses fatores, a concentração do antibiótico necessário para inibir o crescimento ou destruir o microrganismo "***in vitro***" e as concentrações séricas do antibiótico, alcançadas e mantidas durante o tratamento podem ser avaliadas diretamente no laboratório clínico.

Cabe ao médico a responsabilidade da escolha do antibiótico mais apropriado para o tratamento de determinada infecção, tendo em conta cada antibiótico, a doença diagnosticada e as condições do hospedeiro.

A responsabilidade do laboratório clínico é a de fornecer informações sobre a atividade dos antibióticos em relação ao microrganismo isolado, obtidas "***in vitro***", através de técnicas padronizadas.

4.2.5.1 Suscetibilidade e resistência dos microrganismos.

Considera-se sensível a um antimicrobiano o microrganismo que morre ou cujo crescimento é inibido, "***in vitro***", por determinada concentração do antimicrobiano facilmente atingido, "***in vitro***", no local onde se encontra o agente da infecção. O microrganismo é considerado resistente se consegue tolerar a concentração sérica máxima atingida com as doses terapêuticas. Admite-se que as bactérias resistentes podem tolerar concentrações do antimicrobiano duas a quatro vezes maior que a necessária para inibir o crescimento ou matar as bactérias sensíveis da mesma espécie, apesar disso, os termos suscetível e resistente, têm significado relativo. As concentrações alcançadas por um antibiótico no sangue, no líquido cefalorraquidiano e qualquer tecido ou líquido orgânico são muito variáveis, sofrendo influência das doses usadas, dos intervalos com que são administradas e outras propriedades farmacodinâmicas do antibiótico relacionadas com absorção, metabolismo e excreção. O conceito de "sensível e resistente" deve sempre ser submetido a análise crítica, a informação do laboratório clínico fudamenta-se em avaliação feita de acordo com normas padronizadas, segundo as quais determinam a concentração do antimicrobiano que é colocado em confronto, em condições artificiais, com o microrganismo estudado. Essa inteiração é sempre mais complexa "***in vitro***", havendo necessidade de aplicar-se a informação do laboratório clínico com cautela e perspicácia.

4.2.5.2 Indicações do antibiograma

A avaliação da sensibilidade, ou resistência, de um microrganismo a antimicrobianos é feita por intermédio de testes "in vitro" designados genericamente por antibiograma.

A realização de antibiograma para um determinado microrganismo, isolado de material clínico, é sempre indicada quando o agente da infecção não apresenta, habitualmente, comportamento característico em relação aos antimicrobianos, estão incluídos nessa classe de microrganismos:

-Staphylococcus aureus-, enterobactérias, -Haemophilus influenzae-, -Streptococcus-faecalis- (enterococo), -Pseudomonas- sp., determinadas bactérias anaeróbias não esporuladas e algumas bactérias raramente causadoras de doença humana, geralmente associadas com infecção oportunista. A realização do antibiograma pode ser indicada para fins epidemiológicos, pois o

comportamento de um agente infeccioso nos testes de sensibilidade pode colaborar decisivamente para a caracterização de um surto, permitindo, eventualmente, definir a fonte da infecção, sua aplicação pode também ser de agente utilizado no estudo de infecções cruzadas em doentes hospitalizados.

Desaconselha-se a realização de antibiograma para bactéria "saprófitas", componentes da flora normal.

4.2.5.3 Métodos utilizados nas provas de sensibilidade

Prova de difusão

A técnica para realização do antibiograma ainda mais utilizada é a de difusão em disco. A técnica adotada é essencialmente qualitativa, segundo a qual o microrganismo testado é classificado como sensível ou suscetível, intermediário ou resistente. O antimicrobiano a ser utilizado nessa prova é de livre escolha, porém deve-se ter cautela nos detalhes técnicos, usando-se a prova de difusão, é aplicada aos microrganismos que apresentam, velocidade de crescimento similar à das enterobactérias e de ***-Staphylococcus-aureus -***, prova essa também adaptada à bactérias mais exigentes, como ***-Haemophilus influenzae-***, ***-Neisseria - gonorrhoeae -*** produtora de betalactamase e ***Streptococcus-pneumoniae-*** (pneumococos) que desenvolveram resistência à benzilpenicilina e a outros antibióticos.

Em caso de emergência clínica, pode-se fazer o inóculo direto do material biológico, obtido de locais não contaminados com microrganismos da flora normal, para a execução do antibiograma, nessa eventualidade, torna-se obrigatória a confirmação do resultado depois do isolamento do microrganismo em questão. Apesar de ser a mais difundida, a prova de difusão com disco ressente-se de algumas falhas:

a) Não possibilita a obtenção de resultados quantitativos,

b) Não é aplicável à microrganismos de crescimento lento (bactérias anaeróbias, por exemplo),

c) Os resultados são imprecisos quanto à avaliação da sensibilidade ou resistência a determinados antimicrobianos, tais como as polimixinas, em decorrência da fraca difusão desses antibióticos no meio de ágar.

Trata-se, no entanto, de prova muito útil para ser utilizada na rotina, quando há necessidade de dispor de resultados quantitativos, torna-se necessário a realização de provas suplementares, tais como a prova de diluição.

Prova de diluição

Esse método fornece resultados quantitativos diretos, baseados na velocidade de crescimento dos microrganismos, ficando excluídos alguns problemas complexos relacionados com a difusibilidade dos antimicrobianos no meio. A prova de diluição em caldo não tem a mesma versatilidade da prova de difusão, não possibilitando testar diretamente o material biológico, por causa da dificuldade de detecção de contaminantes.

Também é necessário, em relação à prova de diluição em caldo, que o clínico esteja preparado para interpretar adequadamente os resultados apresentados em termos quantitativos. A prova de diluição em caldo é indicada principalmente para o controle terapêutico apropriado dos antimicrobianos em uso. Os dados qualitativos são quase sempre suficientes para orientar a antibioticoterapia da maior parte das infecções; entretanto, a determinação da sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos torna-se indispensável no controle rigoroso do tratamento de determinados pacientes. A informação quantitava da sensibilidade é útil também para a confirmação de resultados duvidosos fornecidos pela prova de difusão com discos, esses resultados ocorrem principalmente nas seguintes eventualidades:

a) Quando se trata de microrganismo de crescimento lento;

b) Quando estiverem sendo utilizados antimicrobianos (as polimixinas, por exemplo) com baixo poder de difusão no ágar;

c) Quando for indicado antimicrobiano potencialmente tóxico, com indicação eletiva para o tratamento da doença causada por agente infeccioso, cuja sensibilidade, avaliada pelo método da difusão, tenha sido intermediária. 0 método de diluição é também indicado para a avaliação da sensibilidade de bactérias anaeróbias, para a determinação da atividade bactericida do antimicrobiano e para a verificação da existência de sinergismo ou antagonismo de associações de antibióticos contra determinado microrganismo.

A prova de diluição demonstrou-se ser prática e econômica para ser aplicada na rotina do laboratório.

Provas Automatizadas

A automatização tornou mais fácil a realização das provas de sensibilidade de microrganismos a antimicrobianos, a realização, a leitura e a interpretação das provas. Teve como principal objetivo substituir com vantagens as provas tradicionais, possibilitando a obtenção dos resultados no mesmo dia, com alto grau de qualidade.

1. Antimicrobianos de primeira escolha.
2. Antimicrobianos de escolha secundária.

Fontes e erros comuns do antibiograma.

Erros técnicos podem comprometer a precisão e a exatidão dos resultados. Um erro pode ser neutralizado pelo efeito de outro, ou somar-se a ele. Os mais comuns são:

a) A não utilização do meio de cultura adequado, e o pH durante o preparo,
b) O uso de meios de culturas com prazo de validade vencida,
c) Contaminação dos equipamentos, e do meio de cultura.
d) Demora na inoculação,
e) Aparelhagem desregulada, e inadequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO NETO, Vicente , LEVI, Guido Carlos, LOPES, Hélio Vasconcellos, [et al]. **Antibióticos na prática médica**. 4.ed., rev. e ampl. São Paulo : Roca, 1994. 283p.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia médica**. 24 ed. Rio de Janeiro. Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. 2009.

MADIGAN, Michael T.; MARTNKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Editora: Artmed. São Paulo. 2010.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro. Edoti ra Elsevier. 2008.

TRABULSI, ALTERTHUM. **Microbiologia**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

5

Métodos de Controle de Crescimento Microbiano

OBJETIVOS

- Conhecer os Métodos de controle de crescimento microbiano;
- Estudar a microbiota humana e as Principais doenças causadas por bactérias e fungos;
- Aprender sobre Infecção hospitalar e sua relação com a microbiota normal;
- Estudar conceitos de Engenharia genética e biotecnologia.

5.1 Métodos de controle de crescimento microbiano

O controle dos microrganismos é um assunto abrangente e de inúmeras aplicações práticas envolvendo toda a microbiologia e não só aquela aplicada à medicina.

"A Esterilização é o processo que promove completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos presentes em um determinado local: vírus, bactérias, fungos, protozoários, esporos, para um aceitável nível de segurança. O processo de esterilização pode ser físico, químico, físico-químico."

5.1.1 Métodos Físicos de controle:

"O método mais empregado para matar microrganismos é o calor, por ser eficaz, barato e prático. Os microrganismos são considerados mortos quando perdem a capacidade de multiplicar."

Calor úmido: A esterilização empregando calor úmido requer temperaturas acima da de fervura da água (120º). Estas são conseguidas nas autoclaves, e este é o método preferencial de esterilização desde que o material ou substância a ser esterilizado não sofra mudanças pelo calor ou umidade. A esterilização é mais facilmente alcançada quando os organismos estão em contato direto como vapor, nestas condições o calor úmido matará todos os organismos.

Calor seco: A forma mais simples de esterilização empregando o calor seco é a flambagem. A incineração também é uma forma de esterilizar, empregando o calor seco. Outra forma de esterilização empregando o calor seco é feita em fornos, e este binômio tempo e temperatura deve ser observado atentamente. A maior parte da vidraria empregada em laboratório é esterilizada deste modo.

Pasteurização: consiste em aquecer o produto a uma dada temperatura, num dado tempo e a seguir, resfria-lo bruscamente. A pasteurização reduz o numero de microrganismos presentes, porém não assegura uma esterilização.

Radiações: As radiações têm seus efeitos dependentes do comprimento de onda, da intensidade, da duração e da distância da fonte. Há pelo menos dois tipos de radiações empregadas no controle dos microrganismos: ionizantes e não ionizantes.

Indicadores biológicos: São suspensões-padrão de esporos bacterianos submetidos a esterilização juntamente com os materiais a serem processados em autoclave, estufas e câmera de radiação. Terminado o ciclo, são colocados em meio de cultura adequada para o crescimento de esporos, se não houver crescimento, significa que o processo está validado.

Micro-ondas: Os fornos de micro-ondas são cada vez mais utilizados em laboratórios e as radiações emitidas não afetam o microrganismo, mas geram calor. O calor gerado é responsável pela morte dos micro-organismos.

Filtração: A passagem de soluções ou gases através de filtros, retêm os microrganismos, então pode ser empregada na remoção de bactérias e fungos, entretanto, não retém a maioria dos vírus.

Pressão Osmótica: A alta concentração de sais ou açúcares cria um ambiente hipertônico que provoca a saída de água do interior da célula microbiana. Nessas condições os micro-organismos deixam de crescer e isto tem permitido a preservação de alimentos.

Dessecação: Na falta total de água, os micro-organismos não são capazes de crescer, multiplicar, embora possam permanecer viáveis por vários anos. Quando a água é novamente reposta, os micro-organismos readquirem a capacidade de crescimento. Esta peculiaridade tem sido muito explorada pelos microbiologistas para preservar micro-organismos e o método mais empregado é a liofilização.

5.1.2 Métodos Químicos de controle

Os agentes químicos são apresentados em grupos que tenham em comum, ou as funções químicas, ou elementos químicos, ou mecanismo de ação.

Álcoois: A desnaturação de proteínas é explicação mais aceita para a ação antimicrobiana. Na ausência de água, as proteínas não são desnaturadas tão rapidamente quanto na sua presença. Alguns glicóis podem ser usados, dependendo das circunstâncias, como desinfetante.

Aldeídos e derivados: Pode ser facilmente solúvel em água, é empregado sob a forma de solução aquosa em concentrações que variam de 3 a 8%. A Metenamina é um anti-séptico urinário que deve sua atividade à liberação de aldeído fórmico. Em algumas preparações, a Metenamina é misturada ao ácido mandélico, o que aumenta seu poder bactericida.

Fenóis e derivados: O fenol é um desinfetante fraco, tendo interesse apenas histórico, pois foi o primeiro agente a ser utilizado como tal na prática médica e cirúrgica, os fenóis atuam sobre qualquer proteína, mesmo aquelas que não fazem parte da estrutura ou protoplasma do micro-organismo, significando que, em meio orgânico proteico, os fenóis perdem sua eficiência por redução da concentração atuante.

Halogênios e derivados: Entre os alogênios, o iodo sob forma de tintura é um dos antissépticos mais utilizados nas práticas cirúrgicas. O mecanismo de ação é combinação irreversível com proteínas, provavelmente através da interação com os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina.

Ácidos inorgânicos e orgânicos: Um dos ácidos inorgânicos mais populares é o acido bórico; porém, em vista dos numerosos casos de intoxicação, seu emprego é desaconselhado. Desde há muito tempo tem sido usados alguns ácidos orgânicos, como o ácido acético e o ácido láctico, não como antisséptico, mas sim na preservação de alimentos hospitalares.

Agentes de superfície: Embora os sabões se encaixem nessa categoria são compostos aniônicos que possuem limitada ação quando comparada com a de substâncias catiônicas. Dentre os detergentes catiônicos os derivados de amônia tem grande utilidade nas desinfecções e antissepsias. O modo preciso de ação dos catiônicos não esta totalmente esclarecida, sabendo-se, porém, que alteram a permeabilidade da membrana, inibe a respiração e a glicólise

de formas vegetativas das bactérias, tendo também ação sobre fungos, vírus e esporos bacterianos.

Metais pesados e derivados: O baixo índice terapêutico dos mercuriais e o perigo de intoxicação por absorção fizeram com que aos poucos deixassem de serem usados, curiosamente alguns derivados mercuriais tiveram grande aceitação, embora dotados de fraca atividade bactericida e bacteriostática in vivo, como o Merbromino.

Agentes oxidantes: A propriedade comum destes agentes é a liberação de oxigênio nascente, que é extremamente reativo e oxida, entre outras substâncias o sistemas enzimáticos indispensáveis para a sobrevivência dos micro-organismos.

Esterilizantes gasosos: Embora tenha atividade esterilizante lenta o óxido de etileno tem sido empregado com sucesso na esterilização de instrumentos cirúrgicos, fios de agulhas para suturas e plásticos.

5.1.3 Terminologias

Esterilização: Processo de destruição de todas as formas de vida de um objeto ou material. É um processo absoluto, não havendo grau de esterilização.

Desinfecção: Destruição de microrganismos capazes de transmitir infecção. São usadas substâncias químicas que são aplicadas em objetos ou materiais. Reduzem ou inibem o crescimento, mas não esterilizam necessariamente.

Antissepsia: Desinfecção química da pele, mucosas e tecidos vivos, é um caso da desinfecção.

Germicida: Agente químico genérico que mata germes.

Bacteriostase: A condição na qual o crescimento bacteriano está inibido, mas a bactéria não está morta. Se o agente for retirado o crescimento pode recomeçar.

Assepsia: Ausência de microrganismos em uma área. Técnicas assépticas previnem a entrada de microrganismos.

Degermação: Remoção de microrganismos da pele por meio de remoção mecânica ou pelo uso de antissépticos.

5.1.4 A microbiota humana: generalidades.

Todo ser humano nasce sem microrganismos. A aquisição da microbiota bacteriana envolve uma transmissão horizontal, ou seja, pela colonização por microrganismos. A colonização de superfícies expostas como a pele, o trato respiratório superior, o sistema geniturinário inferior e o trato digestório, começam imediatamente após o nascimento. Padrões de alimentação, hospitalização e tratamento com antibióticos são fatores que afetam a composição da microbiota intestinal.

As diversas partes do corpo humano apresentam condições ambientais diversas que oferecem certas vantagens e desvantagens para a vida microbiana. Diferentes espécies de microrganismos adaptam-se aos distintos ambientes do corpo.

A microbiota normal humana desenvolve-se por sucessões, desde o nascimento até as diversas fases da vida adulta, resultando em comunidades bacterianas estáveis. Os fatores que controlam a composição da microbiota em uma dada região do corpo estão relacionados com a natureza do ambiente local, tais como temperatura, pH, água, oxigenação, nutrientes e fatores mais complexos como a ação de componentes do sistema imunológico.

Estima-se que o corpo humano que contém cerca de 10 trilhões de células seja rotineiramente portador de aproximadamente 100 trilhões de bactérias. A composição da microbiota bacteriana humana é relativamente estável com gêneros específicos ocupando as diversas regiões do corpo durante períodos particulares na vida de um indivíduo. A microbiota humana desempenha funções importantes na saúde e na doença.

Os microrganismos membros da microbiota humana podem existir como mutualistas, quando protegem o hospedeiro competindo por microambientes de forma mais eficiente que patógenos comuns (resistência à colonização), produzindo nutrientes importantes e contribuindo para o desenvolvimento

do sistema imunológico; (2) comensais, quando mantêm associações aparentemente neutras sem benefícios ou malefícios detectáveis e (3) oportunistas, quando causam doenças em indivíduos imunocomprometidos devido à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, terapia imunossupressora de transplantados, radioterapia, quimioterapia anticâncer, queimaduras extensas ou perfurações das mucosas.

A microbiota humana constitui um dos mecanismos de defesa contra a patogênese bacteriana, mas ainda que a maioria dos componentes da microbiota normal seja inofensiva a indivíduos sadios, esta pode constituir um reservatório de bactérias potencialmente patogênicas. Muitas bactérias da microbiota normal podem agir como oportunistas. Nestas condições a microbiota residente pode ser incapaz de suprimir patógenos transitórios, ou mesmo, alguns membros da microbiota podem invadir os tecidos do hospedeiro causando doenças muitas vezes graves.

Em indivíduos sadios, algumas espécies de bactérias da microbiota oral causam cáries em 80% da população.

A microbiota normal exerce papel importante na proteção contra agentes infecciosos por mecanismos ecológicos e imunológicos, além de contribuir para a nutrição do hospedeiro. Distúrbios na microbiota acarretam prejuízos desses efeitos.

A ingestão de probióticos pode prevenir os efeitos dos distúrbios da microbiota.

Vários mecanismos de ação, obtidos a partir de estudos experimentais, já foram propostos para os probióticos: a proteção ecológica seja pela prevenção da multiplicação dos patógenos ou pela inibição da ação patogênica e modulação do sistema imune, por ativação do sistema fagocitário, produção de imunoglobulinas e citocinas.

5.1.5 Microbiota da pele

A superfície da pele apresenta diversos tipos de micro-ambientes, em áreas mais secas ou mais úmidas, que apresentam populações bacterianas mais esparsas ou mais densas, respectivamente. Nas regiões mais úmidas, como axilas, virilhas, espaço entre os dedos dos pés, genitália e períneo, predominam organismos Gram-positivos como ***Staphylococcus aureus*** e ***Corynebacterium sp***. Nessas áreas, condições como umidade, maior temperatura corporal e maior

concentração de lipídios cutâneos de superfície favorecem o crescimento bacteriano. Nas áreas secas predominam as bactérias ***Staphylococcus epidermidis*** e ***Propionibacterium acnes***. De modo geral, organismos Gram-positivos são os membros predominantes da superfície corporal. A bactéria Staphylococcus epidermidis é o habitante mais numeroso da pele correspondendo à cerca de 90% da microbiota residente em algumas áreas.

Em determinadas situações, as bactérias ***S. aureus*** e ***S. epidermidis*** podem causar doenças de pele e afecções nos cílios denominadas de blefarites, as quais podem evoluir para conjuntivites bacterianas. A quantidade de bactérias vivas na pele de um indivíduo é relativamente constante. A extensão das áreas colonizadas depende parcialmente da exposição da pele a condições particulares e parcialmente da atividade bactericida da própria pele. Um alto grau de especificidade está envolvido na aderência de bactérias nas superfícies epiteliais. Nem todas as bactérias são capazes de se aderirem à pele.

5.1.6 Microbiota da conjuntiva

A conjuntiva (membrana mucosa presente nos olhos dos vertebrados) é praticamente estéril, mas bactérias pertencentes a diversos gêneros podem fazer parte de uma microbiota transitória da conjuntiva sadia. Os gêneros bacterianos mais frequentemente associados à conjuntiva são citados a seguir:

- Cocos Gram-positivos facultativos ***Staphylococcus, Streptococcus***
- Cocos Gram-positivos anaeróbios estritos ***Peptococcus, Peptostreptococcus***
- Cocos Gram-negativos facultativos ***Neisseria***
- Bacilos Gram-positivos facultativos ***Corynebacterium***
- Bacilos Gram-positivos anaeróbios estritos ***Clostridium, Propionibacterium***
- Bacilos Gram-negativos facultativos ***Haemophilus***

Por causa de sua constante exposição ao meio externo, a conjuntiva está sujeita a intensa contaminação microbiana. Contudo, a conjuntiva apresenta um sistema de proteção bastante eficaz. A ação enxaguatória da lágrima através dos movimentos das pálpebras remove a sujeira e os microrganismos que entram em contato com a conjuntiva e por isto uma microbiota de baixa densidade populacional, consistindo de reduzido número de espécies, permanece na superfície da conjuntiva.

Em adição ao fato de a lágrima ser um meio de cultura pobre, na sua composição encontram-se imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima. As imunoglobulinas (IgG) inativam inúmeras bactérias, a lactoferrina atua como sequestrador de ferro que é um nutriente mineral essencial para o metabolismo bacteriano e a lisozima é uma enzima que impede a formação de paredes celulares bacterianas A ação sinergética destes componentes é um fator importante no controle de controle de bactérias. Quando algum fator rompe o equilíbrio entre a microbiota residente e a transitória, pode haver o desenvolvimento de doenças.

Dentre estes fatores encontram-se o desequilíbrio imunológico, o uso indiscriminado de colírios contendo agentes antimicrobianos ou corticoides. Os corticosteroides, por diminuir a resistência do hospedeiro podem aumentar a virulência de espécies patogênicas e pode permitir que microrganismos normalmente comensais comportem-se como patógenos.

5.1.7 Microbiota do esôfago

O esôfago sadio e anatomicamente normal é um órgão praticamente estéril e bactérias, se presentes, são apenas transitórias. Contudo, condições patológicas podem alterar a anatomia do esôfago e predispor o órgão ao estabelecimento de uma microbiota residente, constituída de microrganismos potencialmente patogênicos.

5.1.8 Microbiota do estômago

No estômago, os microrganismos são geralmente transitórios e sua densidade populacional é mantida baixa devido às duras condições ambientais. A quantidade de bactérias logo após as refeições, é estimada em cerca de 101 a 102 bactérias por grama de conteúdo estomacal, sendo praticamente indetectável após a digestão.

A bactéria ***Helicobacter pylori*** habita o estômago de 50% da população mundial. Provavelmente evoluiu com seu hospedeiro humano de modo a adaptar se ao ecossistema gástrico. O relacionamento da bactéria ***H. pylori*** com seu hospedeiro não pode ser prontamente designado como parasítico ou comensal. A persistência desta bactéria em um ecossistema aberto, revestido por um epitélio em constante renovação e seu potencial patogênico é, de alguma forma, análogo ao relacionamento entre os componentes da microbiota do cólon e

seu hospedeiro. Na maioria dos hospedeiros essa bactéria parece comportar-se como comensal, mas em determinados hospedeiros, a bactéria pode provocar gastrite crônica ativa, úlcera péptica e até neoplasias.

5.1.9 Microbiota do trato intestinal

A quantidade de bactérias e o número de espécies presentes em dado segmento do trato gastrintestinal são afetados pelo pH e tempo de retenção de seu conteúdo. O fluxo rápido de conteúdo do intestino delgado proximal tende a inibir o crescimento de muitas bactérias. Por outro lado, o pH relativamente neutro e a prolongada retenção de conteúdo no intestino grosso permitem o desenvolvimento de comunidades microbianas complexas compostas por centenas de distintas espécies de bactérias.

As bactérias residentes do trato gastrintestinal contribuem para salvar parte de energia contida nos carboidratos indigeríveis da dieta como a celulose, hemicelulose e pectina, metabolizando os mesmos em ácidos graxos que são fontes de energia para as células do epitélio intestinal e facilitam a absorção de sódio e água, além de sintetizarem proteínas e vitaminas do complexo B. Em indivíduos sadios, o duodeno é pouco habitado com uma microbiota esparsa e provavelmente transitória, com em torno de 104 bactérias por grama de conteúdo. As bactérias que são mais frequentemente encontradas no duodeno são dos gêneros ***Streptococcus*** e ***Lactobacillus***. Níveis maiores de bactérias no duodeno (105 a 107 por grama de conteúdo) pode ser o reflexo de anormalidades no sistema digestivo (por exemplo, redução no transito intestinal). A atividade peristáltica e a presença de bile podem explicar a escassez de microrganismos no trato gastrintestinal superior.

O íleo apresenta uma microbiota moderada de cerca de 106 a 108 bactérias por grama de conteúdo com predomínio dos gêneros ***Enterococcus***, ***Lactobacillus***, ***Bacteroides*** e ***Bifidobacterium***. O cólon é colonizado por uma densa e complexa comunidade bacteriana com cerca de 110 a 1011 bactérias por grama de conteúdo. Cerca de 400 espécies bacterianas já foram identificadas. Mais de 99% dessas bactérias são anaeróbias estritas, com predomínio dos gêneros ***Bacteroides***, ***Bifidobacterium***, ***Eubacterium*** e ***Clostridium***. Os anaeróbios ocupam a maioria dos nichos disponíveis e produzem produtos metabólicos secundários como os ácidos acético, butírico e propiónico. Os produtos secundários bacterianos e as condições anaeróbicas estritas são fatores que

inibem o crescimento de outras bactérias. Dos cerca de 1% restantes, a bactéria Escherichia coli representa o anaeróbio facultativo mais abundante.

As bactérias do cólon sintetizam vitaminas como biotina, ácido fólico, tiamina, B12 e K e fermentam carboidratos indigeríveis (fibras) em ácidos graxos de cadeia curta que constituem fontes de energia para o hospedeiro. Os diversos habitats do trato intestinal são habitados por espécies residentes e um conjunto variável de espécies transitórias que temporariamente preenchem um nicho vazio. As bactérias transitórias são provenientes de regiões proximais do trato digestivo ou são organismos ingeridos fortuitamente.

A composição da microbiota normal em uma dada região do trato intestinal é de difícil definição pela dificuldade de se distinguir entre microrganismos residentes e transitórios. Muitos desses microrganismos não são cultiváveis em meios de laboratório, de tal forma que permanecem não detectáveis devido às limitações dos métodos convencionais de isolamento e identificação. Modernas técnicas de ribotipagem ***in situ*** poderão fornecer um novo panorama da composição da microbiota gastrintestinal humana.

Inicialmente, quando espaço e nutrientes não são fatores limitantes, as bactérias com as maiores taxas de crescimento predominam. À medida que as populações bacterianas aumentam e diminui a oferta de nutrientes, o trato intestinal torna-se habitado por espécies mais especializadas e a complexidade da microbiota aumenta. Em recém-nascidos predominam bactérias como E. coli e as dos gêneros ***Clostridium***, ***Enterococcus***, ***Lactobacillus***, ***Bacteroides*** e ***Bifidobacterium***, que constituem a maior porção da microbiota fecal enquanto a criança recebe amamentação materna. Crianças de diferentes regiões geográficas apresentam microbiotas fecais distintas refletindo, em parte, o impacto ambiental (condições sanitárias).

O tipo de dieta liquida fornecido à criança é o principal fator de controle da microbiota e imunoglobulinas e outros elementos do leite materno podem ser também importantes.

A estabilidade funcional (em oposição a uma estabilidade meramente numérica ou composicional) das comunidades bacterianas intestinais é constantemente desafiada por diversos fatores. O epitélio intestinal e a camada de muco renovam-se rápida e incessantemente. A atividade peristáltica expõe os diversos segmentos do intestino a uma ampla variedade de bactérias alóctones,

macromoléculas da dieta e secreções gástricas, pancreáticas e biliares. Os fatores que asseguram o estabelecimento e a estabilidade de comunidades bacterianas nos diversos nichos intestinais são praticamente desconhecidos.

5.1.10 Efeito protetor da microbiota intestinal

A microbiota do cólon é um ecossistema complexo com a importante função de controlar populações de muitos microrganismos patogênicos. O trato intestinal é protegido de patógenos de várias formas. O ambiente ácido do estômago e as enzimas proteolíticas secretadas pelas células gástricas matam muitas das bactérias que são ingeridas.

Estudos comparando microrganismos convencionais de animais e isentos mostraram que a microbiota influencia a anatomia, a fisiologia e a longevidade. Nesses estudos, animais sem germes apresentam uma longevidade duas vezes maior que seus pares convencionais e que as causas de morte eram diferentes nos dois grupos. A Infecção geralmente causava morte entre os animais convencionais, e a atonia intestinal frequentemente matava os sem germes.

Essas investigações demonstraram que animais sem germes têm características anatômicas, fisiológicas e imunológicas distintas daquelas dos animais convencionais. Neles, a membrana mucosa do intestino é subdesenvolvida, pouca ou nenhuma imunoglobulina esta presente no soro ou secreções, a mobilidade intestinal é reduzida e a taxa de renovação das células da mucosa intestinal era de quatro dias contra dois nos animais convencionais.

A microbiota residente compete com invasores potenciais por nutrientes e sítios de adesão. Estudos com animais tratados com antibióticos demonstraram que a microbiota protege contra a infecção por patógenos. Animais tratados com estreptomicina (para reduzir a microbiota normal) foram infectados com Salmonella resistente a este antibiótico. Nos animais convencionais são precisos cerca de 106 organismos para estabelecer uma infecção gastrintestinal, mas, nos gnotobióticos cerca de 10 organismos são suficientes. Estudos posteriores sugeriram que produtos de fermentação (ácidos acético e butírico) produzidos pela microbiota normal inibiam o crescimento de ***Salmonella*** no trato gastrintestinal.

5.1.11 Microbiota do trato urinário

O trato urinário é normalmente estéril com exceção do primeiro centímetro distal da uretra que pode conter os microrganismos predominantes na pele. Bactérias tais como ***Staphylococcus epidermidis***, ***Enterococcus sp.*** e ***Corynebacterium sp.*** são isolados frequentemente. Escherichia coli, Proteus sp. e linhagens não patogênicas de Neisseria são achados ocasionalmente (10 a 30% das amostras). Devido à presença de uma microbiota residente na primeira porção da uretra, as análises clínicas da urina devem ser interpretadas com cuidado.

A bexiga e os rins são normalmente estéreis ou, na maioria das vezes, transitoriamente colonizados por baixas concentrações de bactérias. Estes órgãos são protegidos das bactérias da vagina ou da superfície do pênis pela ação do esfíncter da abertura da uretra, que representa uma barreira física. As bactérias que penetram na bexiga são removidas pela micção. A importância dessas duas defesas é exemplificada pelo fato de pacientes com cateteres urinários (que mantêm aberta a entrada da uretra e drenam a urina constantemente) terem alta incidência de infecções do trato urinário.

5.1.12 Microbiota vaginal

A comunidade bacteriana que coloniza a vagina é dominada por bactérias Gram-positiva do gênero ***Lactobacillus***. Pode ter certa variação de pessoa a pessoa, com a idade, pH to trato vaginal e níveis hormonais. As maiores alterações ocorrem nas infecções bacterianas da vagina.

No primeiro mês de vida, bactérias do gênero ***Lactobacillus*** predominam, o que mantém o pH vaginal em torno de 5. A partir do primeiro mês até a puberdade predominam S. epidermidis, Streptococcus sp e E. coli e o pH vaginal eleva-se em torno de 7. Entre a puberdade e a menopausa, devido à ação do estrogênio, ocorre secreção de glicogênio no trato reprodutivo feminino e os membros predominantes da microbiota passam a ser membros dos gêneros ***Lactobacillus, Corynebacterium, Staphylococcus, Streptococcu***s e ***Bacteroides***. Nesse período, bactérias do gênero Lactobacillus respondem por 90% da composição da microbiota vaginal, alcançando níveis 107 a 108 bactérias por grama de fluido vaginal. Devido à prevalência das espécies ***Lactobacillus gasseri***, ***L. johnsoni*** e ***L. jenseni***, o pH do trato vaginal decresce e se estabiliza em torno de 5.

Após a menopausa, com a diminuição da produção de estrogênio, a secreção de glicogênio diminui, o pH vaginal se eleva em torno de 7 e a composição da microbiota volta a ser aquela característica da pré-puberdade. Embora a vagina e o cérvix ser pesadamente colonizados por bactérias, o útero e as tubas uterinas não o são. A questão se o útero é completamente esterilizado não foi, ainda, estabelecida. Se o for, a concentração de bactérias deve ser normalmente muito baixa. As bactérias são impedidas de ascender do cérvix ao útero e às tubas uterinas pelo tampão de muco na abertura cervical. Atividades que rompem esta barreira (aborto, trabalho de parto prolongado) aumentam a incidência de infecções do útero e das tubas uterinas. Foi sugerido que o sêmen, que pode passar através do tampão cervical, pode carregar bactérias vaginais para o interior do útero, mas sua ação como meio de introdução de bactérias no útero é, ainda, especulativa. Na pele da vulva, a bactéria predominante é a S. aureus, correspondendo a cerca de 70% dos espécimes isolados.

5.1.13 Efeito protetor da microbiota vaginal

Existem evidências de que a microbiota bacteriana do trato vaginal reduz a probabilidade de que patógenos tais como bactérias, protozoários parasitas, leveduras como ***Candida albicans*** ou vírus se estabeleçam na vagina.

As linhagens de ***Lactobacillus*** vaginais parecem evitar a colonização da vagina por patógenos causadores de doenças sexualmente transmissíveis, tais como ***Neisseria gonorrhoeae***, ***Trichomonas vaginalis***, ***Candida albicans*** e HIV, ou por patógenos causadores de infecções do trato urinário, tais como ***Ureaplasma urealyticum*** e linhagens uropatogênicas de ***E. coli***. Os lactobacilos vaginais produzem ácido lático que mantém baixo o pH das secreções vaginais, inibindo o crescimento de muitas bactérias, competem por receptores de aderência, no epitélio vaginal, produzem substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, se coagregam com outras bactérias e estimulam o sistema imune vaginal superficial incrementando os mecanismos de defesa locais contra bactérias não-residentes. Além disso, estas bactérias formam um biofilme que evita o acesso de patógenos à mucosa vaginal e do cérvix.

Uma das propriedades mais importantes das linhagens de lactobacilos vaginais é a sua capacidade de liberar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em quantidades significativas. O H_2O_2 é parte de um sistema antimicrobiano que pode inibir a propagação de vírus e o crescimento de bactérias e fungos.

Entre os organismos susceptíveis a este sistema encontram-se o vírus HIV, as bactérias ***E. coli***, ***Gardnerella vaginalis***, ***Chlamydia trachomatis*** e ***Ureaplasma urealyticum*** e a levedura ***Candida albicans***. As linhagens de lactobacilos produtoras de H_2O_2 parecem manter um ecossistema vaginal saudável e proteger o trato genital feminino de organismos potencialmente patogênicos. Estudos clínicos demonstraram um aumento da incidência de infecções por HIV e N. gonorrhoeae em mulheres com ausência de lactobacilos vaginais. Contudo, a proteção do trato vaginal pela microbiota residente não pode ser considerada absoluta e é parte de um sistema que inclui o sistema imune do hospedeiro. Mulheres podem contrair doenças sexualmente transmissíveis em um único coito a despeito da presença da microbiota vaginal. Contudo, a importância da microbiota vaginal normal na proteção contra patógenos pode ser evidenciada no fato de que a terapia com antibióticos pode predispor mulheres à aquisição de infecções geniturinárias, como as causadas por fungos do gênero Candida. Provavelmente, outros membros da microbiota, além dos lactobacilos, também contribuem para a proteção do ambiente da vagina.

5.1.14 Microbiota da nasofaringe

A faringe aprisiona a maioria das bactérias que são inaladas. A faringe e a traquéia contêm primariamente os mesmos gêneros bacterianos encontrados na microbiota oral, juntamente com anaeróbios dos gêneros ***Staphylococcus***, ***Neisseria*** e ***Corynebacterium***. Patógenos potenciais como ***Haemophilus ssp***, micoplasmas e pneumococos podem ser encontrados na faringe. O trato respiratório superior é a porta de entrada para a colonização inicial por muitos patógenos, dentre estes, ***Neisseria meningitidis***, ***Corynebacterium diphtheriae***, ***Bordetella pertussis*** e ***Streptococcus spp***. O trato respiratório inferior (brônquios e alvéolos) é normalmente estéril porque partículas do tamanho de bactérias não os atingem prontamente. Se o fazem, encontram-se com a primeira linha de defesa, os macrófagos alveolares, ausentes na faringe.

As vias aéreas superiores são protegidas por uma microbiota residente que evita a colonização destas áreas por patógenos. Cocos Gram-positivos são componentes proeminentes, mas muitos outros tipos de bactérias são também encontrados nestes sítios.

5.1.15 Microbiota da cavidade oral

As características ambientais da cavidade oral, tais como alta umidade, temperatura relativamente constante (34 a 36°C), pH próximo da neutralidade e disponibilidade de nutrientes, permitem o estabelecimento de uma microbiota altamente complexa composta por cerca de 700 grupos bacterianos que habitam as diversas áreas da boca. Muitas dessas bactérias estão associadas à formação da placa bacteriana sobre a superfície dos dentes com consequente formação de cáries e ocorrência de doenças periodontais tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A composição da microbiota oral varia com a idade, hábitos alimentares, hormônios, fluxo salivar, condições imunológicas e outros fatores como higienização e alcoolismo. A colonização da cavidade oral por microrganismos tem início de seis a dez horas após o nascimento. As espécies pioneiras são as do gênero Streptococcus e provêm principalmente da mãe. Os gêneros bacterianos mais comuns na cavidade oral são citados a seguir:

- Cocos Gram-positivos facultativos: ***Enterococcus, Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus***;
- Cocos Gram-positivos anaeróbios estritos: ***Peptococcus, Peptostreptococcus***;
- Cocos Gram-negativos facultativos: ***Neisseria***;
- Cocos Gram-negativos anaeróbios estritos: ***Veillonella***;
- Bacilos Gram-positivos facultativos: ***Actinomyces, Corynebacterium, Lactobacillus***;
- Bacilos Gram-positivos anaeróbios estritos: ***Bifidobacterium, Eubacterium, Propionibacterium***;
- Bacilos Gram-negativos facultativos: ***Actinobacillus, Campylobacter, Capnocytophaga, Eikenella, Haemophilus***;
- Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos: ***Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Wolinella***;
- Espiroquetas Gram-negativos anaeróbios estritos: ***Treponema denticola***.

A distribuição das bactérias bucais varia qualitativa e quantitativamente de acordo com o habitat. Bactérias do grupo ***Streptococcus mutans*** (***S. mutans, S. sobrinus, S. cricetus*** e ***S. rattus***) e Streptococcus sanguis são encontrados em grandes números nos dentes enquanto que Streptococcus salivarius é isolado principalmente da língua. As espécies ***S. mutans*** e ***S. sanguis*** aparecem na cavidade oral somente após a erupção dos dentes.

Existe pouca informação a respeito da microbiota das mucosas bucais que são colonizadas por baixos números de bactérias, provavelmente devido à alta descamação de suas células superficiais. Os organismos predominantes nas membranas mucosas parecem ser S. oralis e S. sanguis.

A língua abriga uma população bacteriana mais densa e mais diversa com predomínio de ***S. salivarius*** e ***S. mitis*** e ***Veillonella spp***. Supõe-se que a língua atue como um reservatório de bactérias associadas a doenças periodontais uma vez que ***Porphyromonas spp.*** e ***Prevotella spp.*** podem ser isoladas em pequenos números.

5.1.16 Placa bacteriana

Os dentes apresentam uma área superficial abundante para o crescimento bacteriano. Os microrganismos que colonizam os dentes, notadamente os do gênero ***Streptococcus***, produzem um polissacarídeo de aderência. Este os capacita a desenvolver um biofilme bacteriano que se adere à superfície dos dentes, formando comunidades microbianas organizadas em uma matriz complexa, composta de produtos extracelulares microbianos, constituintes salivares, restos alimentares, células mortas e descamadas da boca. Este biofilme é denominado placa bacteriana é a causa principal das cáries e das doenças periodontais. As doenças periodontais, se não prevenidas ou tratadas podem causar mau hálito, sangramento nas gengivas, cáries, abscessos gengivais, perda dos dentes e perda óssea.

Os organismos predominantes da placa bacteriana são descritos a seguir:

- Cocos Gram-positivos facultativos: ***Streptococcus (S. mutans, S. sobrinus, S. cricetus)***;
- Bacilos Gram-positivos facultativos: ***Actinomyces***;
- Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos: ***Porphyromonas (P. gingivalis, P. endodontalis), Prevotella (P. melaninogenica, P. intermédia, P. loescheii, P. denticola).***

As bactérias ***Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella melaninogenica, Prevotella intermedia, Prevotella loescheii*** e ***Prevotella denticola*** raramente são isoladas de gengivas sadias. A complexidade das comunidades bacterianas nas placas bacterianas torna difícil a determinação de um agente cariogênico específico. Há fortes evidências de que bactérias tais como ***S. mutans, S. sobrinus*** e ***L. acidophilus*** estejam envolvidas na iniciação

e progressão das cáries, respectivamente. Estes grupos bacterianos são capazes de metabolizar carboidratos em ácidos (primariamente ácido lático) e tolerar um ambiente com pH baixo. Contudo, grandes quantidades de ***S. mutans*** podem ser encontradas em placas bacterianas sem evidência de cáries.

Dietas ricas em sacarose contribuem para a cariação dos dentes porque o ***S. mutans*** produz um polissacarídeo de aderência especificamente a partir da sacarose que é substrato para a produção do ácido lático. Bactérias láticas como L. acidophilus produzem ácido lático que dissolvem o fosfato de cálcio do esmalte dos dentes. A S. mutans pode, também, causar endocardite subaguda.

5.1.17 Efeito protetor da microbiota bucal

As doenças bucais, parecem ser devido a uma transição de uma associação comensal para uma relação oportunística com o hospedeiro. As bactérias da microbiota bucal podem sobreviver na cavidade oral por serem menos susceptíveis aos mecanismos imunológicos ou por serem capazes de sobrepujá-los. Desta forma, um desequilíbrio no ecossistema bucal pode acarretar a emergência de bactérias potencialmente patogênicas. Para a compreensão dos processos envolvidos na cariogênese e nas doenças periodontais é necessário um entendimento da ecologia da cavidade oral e a identificação dos fatores responsáveis pela transição da microbiota oral de uma associação comensal para uma relação patogênica com o hospedeiro.

Os microrganismos da microbiota da orofaringe são importantes fontes potenciais de infecções, especialmente entre alcoólicos cujas defesas das vias aéreas estão prejudicadas pela ingestão prolongada de álcool. Nestes indivíduos existe uma predominância significativa da presença de enterobactérias e gêneros anaeróbicos como ***Bacteroides, Prevotella, Veillonela, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Bifidobacterium*** e ***Clostridium*** em relação aos não-alcoólicos.

5.2 Probióticos

O controle biológico desenvolvido pelas comunidades microbianas normais (microbiota normal) que colonizam as superfícies ou mucosas do corpo humano representa um mecanismo ecológico potente que, junto com os sistemas de defesas mecânicos, químicos e imunológicos, protegem-nos contra as tentati-

vas de agressão por agentes infecciosos. Uma criança nasce sem nenhum microrganismo associado e, utilizando como doadores a mãe, o ambiente e outros seres humanos (médicos, enfermeiras, parentes), adquirem progressivamente os componentes dos ecossistemas microbianos superficiais responsáveis pelo efeito protetor citado acima. Considera se que as microbiotas normais resultantes atingem um equilíbrio e uma funcionalidade similares aos de um adulto somente após um a dois anos de vida.

Este período representa uma fase crítica de instabilidade e de menor eficiência protetora dos ecossistemas microbianos normais e, portanto, um momento propício à entrada de microrganismos patogênicos. Uma vez instaladas, as microbiótas normais exercem, dependendo do local, efeitos de proteção ecológica, imunomodulação e/ou contribuição nutricional extremamente potente, mas também sujeitos a perturbações. A utilização de substâncias antimicrobianas, as mudanças drásticas de alimentação e o estresse estão entre os fatores mais comuns de interferências no equilíbrio dos ecossistemas microbianos associados e, portanto, nas suas funções benéficas para o hospedeiro.

A definição inicial de probiótico é: suplemento microbiano vivo que quando ingerido afeta beneficamente o hospedeiro animal melhorando o equilíbrio microbiano intestinal. Esta definição é hoje muito restritiva e insatisfatória em vista das consideráveis mudanças decorrentes dos estudos e desenvolvimento dos probióticos. Uma definição talvez mais completa poderia ser: um produto farmacêutico ou alimentar contendo um ou mais microrganismos vivos que melhora as funções (resistência à colonização, imunomodulação, contribuição nutricional) da microbiota local normal quando introduzido num ecossistema superficial (cutâneo, respiratório, urogenital, digestivo) associado ao hospedeiro humano ou animal. Contudo, a definição mais oficial e aceita hoje é à que foi proposta pela FAO/WHO:

"preparação contendo um microorganismo vivo que quando administrado em quantidade adequada produz um efeito benéfico para o hospedeiro".

O critério de seleção e avaliação dos microrganismos probióticos foi resultado das pesquisas institucionais e de universidades com as indústrias de alimentos. A linhagem de bactéria para se classificar como probiótica deve apresentar as seguintes propriedades:

• Possuir identificação taxonômica exata;
• Ser de preferência um habitante normal das espécies alvo;
• Não ser tóxica e patogênica;
• Ser geneticamente estável;
• Ser capaz de sobreviver e estimular a atividade metabólica no trato gastrointestinal;
• Possuir características de aderência;
• Ser capaz de sobreviver durante a preparação, estocagem e consumo;
• Conter população viável elevada, com em torno de 108– 109 bactérias por grama de produto;
• Produzir de substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos;
• Capaz de competir com a microbiota normal;
• Resistir suco gástrico e à bile;
• Ser imunoestimuladora;
• Capaz de exercer outros efeitos benéficos à saúde (documentados e validados clinicamente);
• Apresentar características favoráveis ao processo de produção: crescimento adequado, boa recuperação na concentração, congelamento, desidratação, estocagem e distribuição;
• Apresentar qualidades organolépticas desejáveis.

Exemplos de microrganismos comumente descritos como possuidores de características probióticas são descritos a seguir:

LACTOBACILLUS	BIFIDOBACTERIUM	STREPTOCOCCUS
L. acidophilus	*B. longum*	*S. thermophilus*
L. casei	*B. bifidum*	
L. johnsonii	*B. lactis*	
L. fermentum	*B. breve*	
L. plantarum	*B. infantis*	
L. lactis		
L. rhamnosus		
L. gasseri		
L. reuteri		
L. salivarius		

Tabela 5.1

5.3 Prebióticos

O termo prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não digerível pela maioria dos microrganismos do intestino, e que afeta beneficamente o hospedeiro, pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de apenas um ou de um número limitado de bactérias no cólon. Para um ingrediente alimentar ser classificado como um prebiótico é necessário:

- Não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas do cólon, que são estimuladas para crescerem e desenvolverem atividades metabólicas;
- Ser capaz de promover uma biota intestinal saudável e, como consequência, induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro.

Como exemplo de substâncias prebióticas pode-se citar alguns oligossacarídeos como a lactulose, lactitol, lactosacarose, rafinose, e frutooligossacarídeos (FOS), e polissacarídeos como a inulina e o amido resistente. Muitos alimentos possuem naturalmente FOS em sua composição, como pode ser observado a seguir:

Ocorrência natural de frutooligossacarídeos (FOS) em alimentos.

ALIMENTO	INULINA (%)	OLIGOFRUTOSE (%)
Cebolas	2 – 6	2 – 6
Chicória (raízes)	15 - 20	5 – 10
Aspargos	1 - 30	1 – 20
Alho	9 - 16	3 – 6
Banana	0,3 - 0,7	0,3 - 0,7
Trigo	1 - 4	1 – 4
Centeio	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
Cevada	0,5 - 1,5	0,5 - 1,5
Alho-poró	3 - 10	2,5 - 8,0

Tabela 5.2

Os prebióticos não somente proporcionam aumento potencial do número de bactérias benéficas no intestino grosso de humanos, predominantemente os lactobacilos e as bifidobactérias, mas também aumentam sua atividade metabólica pelo fornecimento de substrato específico fermentável.

5.3.1 Disbiose

Uma microbiota intestinal saudável está diretamente relacionada com a imunidade. Uma microbiota intestinal desequilibrada (disbiose intestinal) apresenta destruição de vitaminas, inativação de enzimas, produção de toxinas cancerígenas, destruição da mucosa intestinal - levando a uma menor síntese e absorção de nutrientes.

São diversos os fatores que desregulam nossa microbiota, variando desde idade, má alimentação, estresse, má digestão, infecções intestinais, até medicamentos ingeridos (principalmente antibióticos). Para adequar a microbiota intestinal, garantindo uma ótima absorção dos nutrientes, o uso de elementos probióticos e prebióticos vem sendo utilizado na prática clínica com excepcional resultado. Eles favorecem a presença de bactérias benéficas ao organismo e diminuem a concentração de bactérias e micro-organismos indesejáveis.

5.3.2 Efeitos atribuídos aos probióticos e prebióticos

Os benefícios à saúde conferidos pelos probióticos são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos pela produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular.

5.3.3 Simbióticos

O termo simbiôntico é utilizado quando o ingrediente alimentar contém tanto os probióticos quanto os prebióticos que afetam o hospedeiro de maneira benéfica. Bactérias bífidas constituem um problema como culturas probióticas, pois são difíceis de serem isoladas e manipuladas, uma vez que são anaeróbias. Quando isoladas, não toleram bem ambiente ácido, sendo, portanto, difíceis de serem carreados em produtos lácteos, fermentados considerados os carreadores universais de bactérias lácteas. Uma alternativa para o aumento de bactérias bífidas no trato gastrointestinal é o emprego de prebióticos.

A interação entre o probiótico e prebiótico in vivo pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao consumo de prebiótico. Isto deve resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico se este for consumido juntamente como prebiótico.

5.3.4 Efeitos fisiológicos dos probióticos e prebióticos

O consumo regular de prebióticos e probióticos pode ser empregado na profilaxia e tratamento de uma série de condições patológicas, a maior parte na esfera da gastroenterologia. Existem evidências de benefícios relacionados ao consumo de prebióticos e probióticos que estão em fase de estudo por diversos grupos de pesquisa. São eles:

1. redução de infecção por ***Helicobacter pylori***, que está associado a gastrites e úlceras pépticas;
2. redução de sintomas de alergias alimentares;
3. regularização da função intestinal, combatendo a constipação;
4. atenuação da síndrome do intestino irritável e doença de Crohn;
5. eliminação dos sintomas da intolerância à lactose;
6. efeitos benéficos no metabolismo mineral, particularmente na densidade e a estabilidade óssea;
7. prevenção do câncer de cólon e outros tipos de câncer;
8. redução do colesterol e concentração de triglicerídeos plasmáticos;
9. resistência a infecções do trato e outros.

5.3.5 Nutrição

A informação sobre as características dos alimentos é cada vez maior e somos muitas vezes confrontados com termos de que nunca ouvimos falar. A carência de vitaminas e de ácidos graxos essenciais pode levar á deficiências nutritivas graves causadas quer pela digestão incompleta de certos grupos de alimentos, quer por deficiente absorção de nutrientes – Disbiose. Daí a necessidade de uma alimentação variada. Mas a alimentação não é tudo. A capacidade de absorção dos nutrientes é fundamental. A variedade dos alimentos numa mesma refeição aumenta a possibilidade da sua absorção. A síndrome de má absorção pode invalidar uma boa dieta.

A disbiose pode levar as deficiências nutritivas graves causadas quer pela digestão incompleta de certos grupos de alimentos, quer por deficiente absorção de nutrientes (carência de vitaminas e de ácidos gordos essenciais). A preocupação da sociedade em incorporar alimentos saudáveis aos seus hábitos nutricionais cotidianos fazem parte da realidade em qualquer época. Os alimentos não são somente vistos como uma forma de saciar a fome, prevenir doenças causadas pela dieta deficiente e de prover ao ser humano os nutrientes necessários à construção, manutenção e reparo de tecidos. Os alimentos têm-se tornado o principal veículo de transporte para uma saúde ótima e bem-estar. Neste contexto tem-se verificado um interesse grande por parte dos consumidores nos efeitos benéficos para a saúde, de determinados alimentos, contendo componentes com atividade fisiológica/biológica para além dos nutrientes, os chamados alimentos funcionais, alimentos desenhados ou nutracêuticos. O grupo dos probióticos está incorporado de forma muito incisiva nessa nova fase da dietoterapia. Referendados pelo conceito da medicina baseada em evidências, conduzem à clara necessidade de incluí-los na prescrição rotineira em saúde e nutrição. A compreensão desta capacidade probiótica representa uma oportunidade importante no tratamento de desordens intestinais, câncer, síndrome metabólica, entre outras condições clínicas.

Qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa exercer efeito benéfico no organismo pode ser considerado alimento funcional. Dentre as inúmeras classes de alimentos funcionais estão os chamados probióticos que são alimentos processados com microrganismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico na flora bacteriana do hospedeiro.

5.4 Principais doenças causadas por bactérias:

5.4.1 Tuberculose: Agente: *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo de Koch.

Quadro clínico: às vezes só em fase avançada da doença surgem a tosse contínua com catarro, dor torácica, emagrecimento e febre(quase sempre no período da tarde), sudorese intensa. Com o esforço da tosse alguns vasos se rompem e o doente passa a eliminar catarro com sangue(hemoptise). É aconselhado que uma tosse que persista por duas semanas ou mais seja avaliada por um médico.

Tratamento: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida.

5.4.2 Hanseníase: Agente: *Mycobacterium leprae*.

Quadro clínico: Uma doença infecto contagiosa que afeta principalmente os nervos e a pele. Atinge homens, mulheres, e crianças de todas as idades, tem período de incubação de 3 a 5 anos.

Os principais sintomas são o aparecimento, na pele, de pontos com falta de sensibilidade. Geralmente, aparece apenas um ponto no início. Antes de tudo a pessoa perde o tato, depois a sensibilidade térmica e, por último, a sensibilidade à dor, de forma que, embora sofra queimaduras e espetadelas naqueles pontos, o doente não sente absolutamente nada. Os doentes de lepra também podem apresentar lesões nervosas com dor, paralisia e atrofia muscular. Em casos raros e adiantados, ou resistentes ao tratamento, aparecem também deformidades no rosto, com ulcerações, queda das sobrancelhas, etc.

Tratamento: Dapsona, Rifampicina, Clofazimina, PQT.

5.4.3 Tétano: Agente: *Clostridium tetani*.

Quadro clínico: doença infecciosa, não contagiosa, e como o nome diz, caracteriza-se por contraturas musculares. Os sintomas manifestam-se primeiramente nos músculos da região do ferimento(tétano local). Frequentemente também são atingidos os músculos mastigadores de maneira a tornar difícil a

abertura da boca(trismo). Gradualmente, a contratura se estende a outros grupos de músculos, conferindo a doença feições características. Riso sardônico, rigidez de nuca, abdômen em tábua. A morte sobrevem com espasmos generalizados. É relativamente frequente nos países subdesenvolvidos o Tetanus neonatorum, resultante da contaminação por sujidades várias aplicadas no coto umbilical com o objetivo de acelerar a cicatrização.

Tratamento: aplicação de S.A.T. (soro antitetânico), e relaxantes musculares.

5.4.4 Cólera: Agente: *Vibrio cholerae.*

Quadro clínico: tem um período de incubação de 1 a 4 dias. Início rápido com náuseas, vômitos, cólicos abdominais e diarréia profusa e fezes riziformes (aspecto de água de arroz). A perda rápida de água e sais minerais, conduz a um estado de desidratação, acompanhada de hipotermia, queda de pressão arterial, anúria, e colapso circulatório, acidose por perca de bicarbonato e em crianças, hiperkalemia. Mais de 90% das pessoas que contraem cólera, permanecem assintomáticas, podendo sofrer apenas uma diarréia branda, embora possam transmitir a doença por cerca de 30 dias.

Tratamento: combate a desidratação e antibioticoterapia.

5.4.5 Difteria: Agente: *Corynebacterium diphteriae* , ou bacilo de Klebs Löfler.

Quadro clínico: doença infecto contagiosa aguda que ataca sobretudo crianças de 1 a 4 anos. Caracteriza-se por febre, inflamação na garganta e manifestações toxemicas. As amígdalas, pilares anteriores e úvula se recobrem de um exsudato pseudomembranoso, constituída de fibrina, leucócitos e epitélio necrosado, efeito local da toxina secretada pelo bacilo diftérico. Nos casos graves, o processo se estende à laringe, brônquios causando asfixia (crupe).

Esta toxina, lançada na corrente sanguínea poderá afetar o coração, sistema nervoso, rins dentre outros órgãos. Há destruição local do palato mole, provocando deformidades na fala.

Tratamento: soro antidiftérico, e antibiótico como: penicilina, tetraciclina e cloranfenical.

5.4.6 Coqueluche: Agente: *Bordetella pertussis.*

Quadro clínico: doença infecciosa, aguda, altamente contagiosa que lesa o trato respiratório, produzindo tosse espasmódica característica. Inicia-se com uma coriza, confundindo-se com um simples resfriado, mais ou menos 10 dias depois, tem a evolução característica. Sua gravidade varia com a idade, o estado geral e a maior ou menor sensibilidade de cada indivíduo. Geralmente não é grave.

Tratamento: antibióticos de largo espectro, principalmente cloranfenicol e tetraciclina. Evitar situações que provoquem acesso de tosse, boa alimentação em pequenas quantidades, preferencialmente na forma líquida; manter ambientes arejados evitando a poeira.

5.4.7 Botulismo: Agente: *Clostridium botulinum.*

Quadro clínico: o botulismo é uma toxicose aguda que aparece em algumas horas (2 a 48hs) após a ingestão de alimentos contaminados. Caracteriza-se por vômitos, constipação intestinal, sede, visão dupla, dificuldade de deglutição e fala, flacidez muscular generalizada, paralisia respiratória. A morte sobrevem em 20 a 70% dos casos.

Tratamento: antitoxina botulímica polivalente (a, b, e), precocemente em dose maciça.

5.4.8 Febre tifóide: Agente: *Salmonella typhi*.

Quadro clínico: o bacilo ataca principalmente o intestino, apresentando diarréia com cólicas, febre e muitas vezes presença de sangue nas fezes. As toxinas produzidas pelas bactérias caem na corrente sanguínea e determinam um quadro de erupção cutânea à nível de abdome e um certo torpor pela impregnação no S.N.C. (sistema nervoso central).

Tratamento: Cloranfenicol.

5.4.9 Escarlatina: Agente: *Streptococcus pyogenes*.

Quadro clínico: tem um período de incubação de 3 a 4 dias. É uma infecção aguda, contagiosa caracterizada por febre elevada, inflamação na garganta, exantema, seguida de descamação. Durante o período de infecção pode-se verificar

uma espécie de halo-claro , pálido ao redor da boca, o que constitui o sinal de Filatov. Além disso as papilas linguais mostram-se aumentadas de tamanho caracterizando a chamada "língua de framboesa".

Tratamento: Antibioticoterapia.

5.4.10 Sífilis: Agente: *Treponema pallidum*.

Quadro clínico: doença venérea endêmica, contagiosa e crônica. É provocada por um treponema, gênero pertencente à família das espiroquetas. Produz lesões de caráter inflamatório e destrutivo em quase todos os órgãos. Após 15 ou 20 dias do contágio, aparece um pápula ou mancha indolor e dura, chamada cancro sifilítico, que geralmente se localiza nas áreas genitais externas, mas também pode apresentar-se em qualquer em qualquer parte do corpo, como por exemplo: a boca, o ânus, e as mãos. Quando não é feito um tratamento adequado , as lesões da sífilis se espalham por todo o corpo. A parecem manchas rosadas de 5mm de diâmetro, afetando os folículos pilosos, o que provoca a queda dos pêlos em forma de placas. Tudo isso acompanhado de dores ósseas e musculares, febre ,perda de peso, e inapetência. Existem casos em que são afetados o coração, rins e cérebro.

Tratamento: Penicilina.

5.4.11 Processos supurativos: Agente: *Estafilococos*, e *estreptococos*.

Quadro clínico: infecções onde ocorrem a formação de pus, como: abcessos(-coleção purulenta circunscrita, superficial, ou profunda), furúnculos (abcesso subcutâneo. Inicia-se como zona de intensa inflamação, vermelhidão e calor em uma área circunscrita da pele e que evoluem para o desenvolvimento de uma bolsa cheia de pus, se abrem para o exterior e drenam seu conteúdo), antrazes (furúnculos que fistulam seu conteúdo para o exterior através de várias bocas), feimões (abcessos que se desenvolvem ao longo do tecido subcutâneo, às vezes se alastrando por baixo das aponeuroses). A espécie mais típica é o Staphilococcus aureus resistente à vários antibióticos, somente sensível à Vancomicina, é o temível M.A.R.S.A. , bactéria super resistente, produzida por uso indiscriminado de antibióticos.

Tratamento: Penicilina, e no caso de infecção por M.A.R.S.A. , Vancomicina.

5.5 Doenças causadas por fungos

Os fungos são geralmente reconhecidos, primeiramente, pela sua capacidade de decompor a matéria orgânica.

Relativamente poucos fungos são suficientemente virulentos para serem considerados patógenos primários. Estes são capazes de iniciar uma infecção em um hospedeiro normal, aparentemente imunocompetente. Eles são capazes de colonizar o hospedeiro, encontrar um nicho microambiental com substratos nutricionais suficientes, a fim de evitar ou subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro, e se multiplicar dentro do nicho microambiental.

Entre patógenos fúngicos primários conhecidos se encontram quatro fungos ascomicetos, os patógenos dimórficos endêmicos ***Blastomyces dermatitidis***, ***Coccidioides immitis*** (e ***C. posadasii***), Hstoplasma capsulatum e ***Paracoccidioides brasiliensis***. Cada um destes microrganismos possui fatores de virulência que lhes permitem romper ativamente as defesas do hospedeiro e que habitualmente restringem o crescimento invasivo de outros microrganismos. Quando um grande número de conídios desses quatro fungos é inalado por humanos, mesmo se esses indivíduos forem saudáveis e imunocompetentes, habitualmente ocorre infecção e colonização, invasão tecidual e disseminação sistêmica do patógeno. Como ocorre com a maioria dos patógenos microbianos primários, estes fungos podem também agir como patógenos oportunistas, uma vez que as formas mais severas de cada uma destas micoses são vistas mais frequentemente em indivíduos com comprometimento das defesas imune inata e adquirida.

Geralmente, indivíduos saudáveis e imunocompetentes apresentam alta resistência inata à infecção fúngica, apesar de serem constantemente expostas às formas infecciosas de diversos fungos presente como parte da microbiota endógena (endógenos) ou no ambiente (exógenos). Os patógenos fúngicos oportunistas, como ***Candida***, ***Cryptococcus spp.*** e ***Aspergillus spp.***, somente causam infecção quando ocorrem quebras nas barreias protetoras da pele e membranas mucosas ou quando a falhas no sistema imune do hospedeiro. Entretanto, mesmo nas infecções oportunistas, há fatores associados ao organismo, e não ao hospedeiro, que contribuem para a capacidade do fungo causar doença.

Além dessa função, algumas espécies são capazes de provocar infecções, tanto em plantas quanto em animais e em humanos.

Em humanos, as infecções fúngicas não costumam evoluir para quadros mais sérios de complicação. Entretanto, quando se trata de alguém com a imunidade comprometida, como portadores do vírus HIV, diabéticos, transplantados, etc., podem ser devastadores e, inclusive, provocar a morte em curto espaço de tempo.

Muitos fungos vivem, de forma harmoniosa, em nosso corpo. Entretanto, situações que propiciam sua superpopulação podem provocar problemas. A candidíase e a pitiríase versicolor (pano branco) são alguns exemplos. Ambas são micoses, que é o resultado da proliferação demasiada destes organismos na pele. Em alguns casos, os mesmos agentes de infecções cutâneas, ou outras espécies, podem colonizar regiões diferenciadas, como o aparelho respiratório, sistema nervoso, genital e gastrointestinal. Para agravar o quadro, algumas liberam toxinas: as chamadas micotoxinas piorando ainda o quadro.

Pitiríase Versicolor - Pano Branco: A pitiríase versicolor é uma micose de pele muito comum provocada pelo fungo do gênero Malassezia. A pitiríase versicolor também é conhecida pelos nomes pano baco, micose de praia ou tínea versicolor. O pano branco não é uma doença contagiosa, portanto não há transmissão do fungo de uma pessoa para outra.

Candidíase: A candidíase nos órgãos genitais é uma infecção muito frequente nas mulheres, mas pode também acometer homens, sejam eles crianças ou adultos. A candidíase no homem se manifesta como uma balanite, que é a inflamação da glande. Se houver também inflamação do prepúcio, a infecção chama-se balanopostite por Candida.

Candidíase oral: A candidíase oral, chamada popularmente de sapinho, é uma infecção da orofaringe provocada pelo fungo Candida albicans. Ao contrário do que muita gente pensa, a candidíase na boca não é uma problema exclusivo de pacientes com HIV. Ela realmente pode ser um dos sinais de AIDS, mas costuma também surgir com frequência em crianças e idosos.

Candidíase Vaginal: A Candidíase vaginal, também chamada de vulvovaginite por cândida, é uma micose provocada pelo fungo da espécie cândida, habitualmente, a Candida albicans. Outras formas de cândida, como a Candida

glabrata, também podem provocar vulvovaginite, mas são bem menos comuns. A candidíase vaginal é uma forma de vaginite extremamente comum.

Micose Na Virilha - Tinea cruris: A micose na virilha, chamada em medicina de tinea cruris, é uma das infeções fúngicas da pele mais comuns. A tinea cruris costuma atingir as regiões inguinal (virilhas), coxas e nádegas, causando placas avermelhadas e intensa coceira.

Frieira - Pé De Atleta: A dermatofitose dos pés, conhecida também como tinea pedis, frieira ou pé de atleta, é a micose de pele mais comum no mundo. A frieira é uma infecção por fungos, que ataca preferencialmente a sola e os espaços entre os dedos dos pés.

Micose De Unha – Onicomicose: Onicomicose (tinea unguium), conhecida popularmente como micose de unha, é o nome dado à infecção da unha causada por fungos. A onicomicose é uma infecção comum, acometendo cerca de 10% da população adulta e 20% dos idosos.

5.5.1 Diagnóstico

O diagnóstico para doenças causadas por fungos e feito, basicamente, com a análise das feridas ou do local atingido pelo problema. Exames de pele e de sangue também ajudam o paciente a conseguir identificar corretamente o tipo de fungo que o acometeu.

É importante o diagnóstico imediato para evitar que os fungos formem uma superpopulação no organismo acarretando para um problema mais difícil de ser curado.

5.5.2 Prevenção

A melhor maneira de se prevenir uma doença fúngica é fazendo uma boa higiene pessoal. Lavar bem o corpo enquanto se toma banho é fundamental par evitar que os fungos evoluam. Lavar bem e diariamente as regiões dos órgãos genitais e partes íntimas pessoais reduz bastante os riscos de se acometer por uma doença fúngica.

5.5.3 Tratamento

Apesar de incômodas, por causar feridas, ardor e irritabilidade, as doenças causadas por fungos são bem simples de serem tratadas. O tratamento pode ser feito com medicamentos antibióticos, para o combate ao fungo, ou até mesmo com pomadas e remédios que agem como esterilizador da pele e de órgão genitais.

A maioria das infecções fúngicas cutâneas, excetuando-se as do couro cabeludo e das unhas, são leves. Os ingredientes ativos das medicações antifúngicas incluem o miconazol, o clotrimazol, o econazol e o cetoconazol.

Quando a aplicação do creme é interrompida muito precocemente, a infecção pode não ser erradicada e a erupção retorna. Podem transcorrer vários dias até os efeitos dos cremes antifúngicos serem observados. Neste período, cremes de corticosteróides são frequentemente utilizados para aliviar o prurido e a dor. Para as infecções mais graves ou resistentes, o médico pode prescrever vários meses de tratamento com outros medicamentos, algumas vezes concomitante com cremes antifúngicos.

Doenças fúngicas dificilmente oferecem risco de morte ao paciente, mas em casos de imunidade baixa pode levar o acometido ao óbito. Por isso, o tratamento é muito importante e deve ser seguido à risca para evitar que o fungo permaneça no organismo por muito tempo.

Seleção de Fungos Causadores de Doenças

CATEGORIA	GÊNERO/ESPÉCIE	DOENÇA
Leveduras	Cândida albicans Cryptococcus neoformans	Estomatite, vaginite, infecção das unhas, infecção sistêmica criptococose(infecção pulmonar, meningite, etc).
Mofo	Espécies de Aspergillus Espécies de Mucor e Rhizopus e outras espécies de mofo do pão Vários dermatófitos	Aspergilose (infecção pulmonar, infecção sistêmica) Mucormicose (infecção pulmonar, infecção sistêmica) Infecções o por tinhas
Fungos	Blastomyces dermatitidis Coccidioides immitis	Blastomicoses (principalmente doença pulmonar e cutânea) Coccidioidomicose (infecção pulmonar, infecção sistêmica)
Dimorfos	Histoplasma capsulatum Sporothrix shenckii	Histoplasmose (infecção pulmonar, infecção sistêmica) Esporotricose (doença cutânea)
Outros	Pneumocytis jiroveci	Pneumonia por pneumocystis (PCP)

Tabela 5.3

5.6 Infecção hospitalar e sua relação com a microbiota normal

Há pouco mais de 150 anos atrás, os hospitais eram considerados insalubres e ficavam restritos a inválidos e excluídos, em uma assistência mais humanitária que científica. As consequências práticas da microbiologia comprovando a etiologia microbiana das doenças infecciosas e principalmente o desenvolvimento do controle de infecção hospitalar foram fundamentais para a gênese do Hospital moderno, considerado seguro para o exercício profissional de clínicos, cirurgiões, enfermeiros entre outros, podendo finalmente congregar esforços para a recuperação da saúde humana.

A maioria das infecções hospitalares tem origem endógena, devido ao desequilíbrio da relação que o homem estabelece com sua microbiota, que é favorecido pela patologia de base, utilização de procedimentos invasivos e a pressão seletiva em favor dos germes resistentes, exercida pelos antibióticos. A infecção exógena é limitada pela pequena capacidade que esta microbiota apresenta de sobrevivência no meio ambiente, na ausência de matéria orgânica que favoreça sua proliferação, principalmente sangue, secreções e excretas eliminadas pelos pacientes. Na transmissão cruzada de infecções, as mãos da equipe assumem capital importância, seguidas pelos artigos, insumos e medicamentos que terão contato com o paciente. Surtos de infecção, que embora sejam dramáticos, despontam o problema na imprensa leiga, representam pouco mais que 5,0% desses episódios, mas potencialmente evitáveis.

A análise dos principais desafios do controle de infecção, parte de sua ocorrência: o paciente e sua patologia, os procedimentos invasivos, a microbiota hospitalar, os profissionais de saúde e o atendimento prestado. Desde a promulgação da Lei Federal 6.431 de 1998, todos os hospitais brasileiros são obrigados a terem constituído uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), que deve elaborar o Programa de Controle de Infecções, definido como um conjunto mínimo de ações para reduzir ao máximo possível à incidência e gravidade das infecções hospitalares. Assim, quem não tiver constituído sua comissão ou se ela não for atuante, elaborando um programa de controle eficaz, já incorre em um delito e pode sofrer as consequências legais decorrentes desse erro.

Com o envelhecimento populacional, a nossa sociedade torna-se progressivamente menos resistente às infecções. Paradoxalmente, o sucesso da medicina provoca-lhe mais uma armadilha. Pacientes graves, em extremos de idade, que até a bem pouco tempo atrás não sobreviviam hoje se mantém vivos à custa da alta tecnologia, de cuidados assistenciais de qualidade, mas são extremamente vulneráveis às infecções hospitalares. Pacientes mais graves, suscetíveis às infecções, cada vez mais dependentes dos cuidados assistenciais, com mais procedimentos invasivos, formam o palco para o enredo dramático das infecções hospitalares. Às vezes a vida artificialmente mantida torna-se um substrato para a proliferação de germes resistentes, que são disseminados por atarefados profissionais de saúde, que na sua luta por salvar vidas, mal têm tempo para lavar suas mãos e assim transmitem esses selecionados assassinos invisíveis.

Os avanços tecnológicos na área da saúde são impressionantes. Se der vida às pessoas parece ser o maior bem que a ciência pode prestar à humanidade, seu alto custo, devorando parcelas progressivas da riqueza mundial, tanto em países ricos como nos pobres, cobra um alto preço, que compromete recursos que poderiam ser empregados em outras áreas importantes, interferindo com a qualidade de vida dos sobreviventes. Esta tecnologia pode aprimorar diagnóstico e tratamento dos pacientes, sua qualidade de vida, reduzir a incidência de complicações entre as quais as infecções hospitalares. Restrições ao emprego desta tecnologia, podem comprometer o resultado final do atendimento, gerando mais problemas na já atribulada relação dos profissionais e instituições de saúde com a sua clientela. Além disso, o risco ocupacional ronda a assistência, principalmente onde ela é mais urgente e necessária. Muitos recursos empregados visam reduzir estes riscos, tornando mais segura a prática profissional. Com tantas opções, tona-se imprescindível a orientação dos investimentos, onde a CCIH pode desempenhar um papel fundamental, subsidiando a definição de investimentos e medindo resultados.

Com os custos crescentes, os atritos entre os prestadores e os financiadores da assistência são totalmente previsíveis. A regulamentação dos planos de saúde, sua cobertura, elaboração de relatórios, detalhamento minucioso de cada cuidado prestado, qualidade das informações em prontuários, procedimentos tendo que ser justificados, prejuízos, reclamações, tudo isso e muito mais envolve cada atendimento prestado. A solução passa pela elaboração de

protocolos clínicos, que além de aprimorar a interação multi-profissional e qualidade assistencial, procura trazer aos pacientes as melhores práticas, baseadas em evidências. A adequação da tecnologia e da prescrição de antibióticos tem um papel fundamental no sucesso desta estratégia. A CCIH pode ser o principal aliado, pois conhecem as ferramentas epidemiológicas, as infecções hospitalares e a flora microbiana da instituição, estando mais apta para responder a este desafio. Evidentemente, a medicina tradicionalmente encarada como exercício liberal, pode se insurgir contra este "cerceamento profissional", gerando conflitos de ordem ética. Cabe a CCIH conquistar o corpo clínico, difundindo seus conhecimentos e as vantagens de um trabalho em equipe.

A grande maioria das doenças que emerge na comunidade é consequência da atividade humana. Possuindo a maior reserva tropical do mundo, progressivamente sendo devastado, o Brasil é uma vítima potencial destas novas pragas. Os pacientes por sua gravidade, dificuldades diagnósticas ou terapêuticas, serão fatalmente atendidos em hospitais, necessitando de um eficiente sistema de saúde, para que a doença não se dissemine entre os profissionais e demais pacientes e ao mesmo tempo, seja notificada, para que as autoridades sanitárias tomem logo as devidas providências.

Concomitantemente, dentro de cada hospital as pressões seletivas que os antimicrobianos exercem sobre a flora hospitalar, ao lado de falhas nas medidas básicas para conter a disseminação microbiana, contribuem para um aumento assustador da resistência aos antibióticos. Os exemplos são múltiplos e falam por si só: ***S aureus*** resistente a meticilina; ***S aureus*** com sensibilidade intermediária à vancomicina; Enterococo resistente a vancomicina; enterobactérias produtoras de beta-lactamases de amplo espectro; bacilos Gram negativos não fermentadores multi-resistentes; micobactérias multi-resistentes, etc.

5.6.1 Fatores de Virulência Bacteriana

Algumas bactérias habitam naturalmente certos nichos do corpo humano, outras são sempre patogênicas; entretanto todas podem causar doenças quando instaladas em ambiente estéril.

5.6.2 Colonização, Adesão e Invasão

Certas bactérias produzem moléculas específicas para aderirem ao tecido do hospedeiro. Adesinas, fímbrias e o ácido lipoteicoico são exemplos de substâncias produzidas para auxiliar na colonização.

Outras bactérias produzem uma espessa e pegajosa matriz de polissacarídeos. O biofilme ajuda na fixação/ adesão/ colonização da população bacteriana e muitas vezes confere certa resistência à ação de antibióticos não observados em cultura in vitro.

5.6.3 Ações Patogênicas das Bactérias

Seres procariontes produzem enzimas, ácidos, toxinas e até gases associados à destruição tissular. Exotoxinas são enzimas citolíticas que podem ser produzidas tanto por Gram positivas quanto por Gram negativas. A toxina tetânica, a toxina botulínica e a estreptolisina são exemplos de exotoxinas.

Endotoxina é o lipopolissacarídeo (LPS) de parede celular exclusivo de bactérias Gram negativas. LPS causa um processo inflamatório sistêmico e severo caracterizado por ativação de complemento, degranulação mastocitária, ativação plaquetária secreção de citocinas de fase aguda (IL1, IL6 e TNF), podendo causar CIVD (coagulação intravascular disseminada), característica do choque séptico.

Algumas bactérias funcionam como superantígenos, uma vez que podem ativar linfócitos sem precisar de processamento antigênico. Superantígenos se ligam ao MHCII (complexo de histocompatibilidade tipo 2) de células apresentadoras de antígeno e ao TCR (receptor de célula T) ao mesmo tempo. Dessa forma, superantígenos ativam linfócitos sem a necessidade de coestimulação.

Ainda por um mecanismo de mimetismo molecular, antígenos bacterianos podem ser "confundidos" com autoantígenos, causando reações cruzadas com tecidos do organismo. É o caso da febre reumática pósestreptocócica (***S. pyogenes***).

5.6.4 Mecanismos de Escape

Bactérias desenvolvem diversos mecanismos de escape das defesas do hospedeiro.

Cápsulas são estruturas externas à parede celular, de constituição polissacarídea ou protéica, pouco imunogênicas. Bacterias encapsuladas sofrem menos reatividade do sistema imunológico. As cápsulas bacterianas das cepas mais prevalentes podem ser utilizadas para a síntese de vacinas, como ocorre na imunização para pneumonia pneumocócia (Streptococcus pneumoniae). Culturas mistas de bactérias encapsuladas com bactérias desprovidas de cápsula mostram uma conversão destas àquelas, provavelmente devido à troca de material genético entre as cepas. A cápsula define a virulência de muitas bactérias. Sem ela, normalmente não são patogênicas.

Para escapar do ataque imunológico do hospedeiro, bactérias assumem várias estratégias: Impedir a opsonização por anticorpos e/ou por complemento:

– Inibir fusão do fagossomo com o lisossomo;
– Escape do fagolisossomo para o citoplasma;
– Resistir às enzimas lisossômicas e multiplicarse no interior da célula (ex: ***Mycobacterium leprae***).

5.6.5 Engenharia Genética e Biotecnologia

O uso da biotecnologia teve o seu início com os processos fermentativos, cuja utilização transcende, de muito, o início da era Cristã, confundindo-se com a própria história da humanidade, quando esta se tornou sedentária. Um exemplo simples pode ser observado na obtenção e manutenção dos alimentos ou quando o homem aprendeu a domesticar animais e a desenvolver a agricultura, deixando assim de depender por completo da caça ou da coleta.

PERÍODO	ACONTECIMENTO
6.000 a.C.	Bebidas alcoólicas (cerveja e vinho) são produzidas por sumérios e babilônios
2.000 a.C.	Panificação e bebidas fermentadas são utilizadas por egípcios e gregos
1875 d. C.	Pasteur mostra que a fermentação é causada por microrganismos
1880-1910	Surgimento da fermentação industrial (ácido láctico, etanol, vinagre)
1922	Sementes híbridas de milho começam a ser comercializadas.
1910-1940	Síntese de glicerol, acetona e ácido cítrico
1940-1950	Antibióticos são produzidos em larga escala por processos fermentativos
1953	Estabelecida a estrutura do DNA (Wilson e Crick revelam a estrutura do DNA)

PERÍODO	ACONTECIMENTO
1073	Início da engenharia genética (Cohen e Boyer transferem um gene de um organismo para outro)
1982	Insulina humana é produzida por engenharia genética
1994	O primeiro alimento geneticamente modificado, o tomate Flavr Savr, chega aos supermercados dos EUA
2000	O arroz geneticamente modificado é criado
2003	O Projeto Genoma, que identificou o mapa genético humano, é concluído

Tabela 5.4 – Fonte: www.bioinfo.ufpb.br/difusao.

A Biotecnologia, ou os processos biotecnológicos, podem ser definidos como: “A nova bio-tecnologia”, a utilização de células e moléculas biológicas para a solução de problemas ou produção de produtos ou processos úteis, com potencial industrial em diversas áreas do conhecimento. Dentre as tecnologias desenvolvidas até o momento, a biotecnologia é, de longe, a que apresenta maior compatibilidade com a sustentabilidade da vida neste planeta.

O seu impacto atinge vários setores produtivos, oferecendo novas oportunidades de emprego e renda. Dentre os inúmeros exemplos, tais como, plantas resistentes a doenças, plásticos biodegradáveis, detergentes mais eficientes, biocombustíveis, processos industriais e agrícolas menos poluentes, métodos de biorremediação do meio ambiente e centenas de testes diagnósticos e novos medicamentos.

5.6.6 Grandes áreas da biotecnologia

A contribuição das biotecnologias ao desenvolvimento de produtos e processos deve ser analisada em função do impacto causado em cada uma das grandes áreas, com destaque, a “Biotecnologia Branca”: diz respeito às aplicações industriais e ambientais; “Biotecnologia Vermelha”: inclui as aplicações relativas à saúde; “Biotecnologia Verde”: dedica-se às aplicações agrícolas e alimentares; “Biotecnologia Azul”: dedica-se a aplicações com origem em organismos aquáticos. Contudo, espera-se que o desenvolvimento de novas tecnológicas possibilite a conservação ou criação de empregos.

A Biotecnologia Branca diz respeito às aplicações industriais e ambientais: Inclui os processos industriais que utilizam enzimas e organismos para processar e produzir químicos, materiais e energia. Segue abaixo as principais áreas de atuação:

- Biorremediação de vazamentos de petróleo e resíduos tóxicos;
- Monitoramento de poluentes (biosensores);
- Tratamento de resíduos industriais e águas residuárias;
- Biomineração (recuperação de metais pesados e radioisótopos);
- Recuperação de áreas degradadas (micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênios).

A Biotecnologia Vermelha inclui as aplicações relativas à saúde: Esta área inclui a utilização de processos relacionados com a medicina e a farmacologia e que se baseiam na manipulação genética de organismos. Segue abaixo as principais áreas de atuação:

- Compostos farmacologicamente ativos;
- Antibióticos, antimicrobianos e antivirais;
- Vitaminas e hormônios;
- Vacinas e probióticos;
- Biopolímeros de aplicação médica (e.g., pele artificial);
- Biotransformações em química fina.

A Biotecnologia Verde dedica-se às aplicações agrícolas e alimentares: As aplicações biotecnológicas desta área incluem métodos de melhoramento de variedades vegetais e animais, visando a agro-indústria. Segue abaixo as principais áreas de atuação:

- Aumento de fertilidade do solo;
- Fixação biológica de nitrogênio;
- Controle biológico de insetos e patógenos;
- Promotores de crescimento de plantas;
- Promotores de crescimento animal;
- Antiparasiticidas, antibióticos, antimicrobianos, antivirais;
- Vitaminas e hormônios;
- Vacinas e probióticos.

As aplicações biotecnológicas desta área incluem métodos de produção e preservação de alimentos, visando a indústria de alimentos. Segue abaixo as principais áreas de atuação:

- Produção e preservação de alimentos;
- Produção de bebidas;

- Aromas e essências;
- Aditivos para alimentos (emulsificantes e espessantes);
- Alimentos funcionais (nutracêuticos).

A Biotecnologia Azul dedica-se a aplicações com origem em organismos aquáticos: Esta área envolve a aplicação de métodos moleculares com base em organismos marinhos e de água doce, ou nos seus tecidos, células ou componentes celulares. Segue abaixo as principais áreas de atuação:

- Ambiental;
- Indústria de alimentos;
- Indústria Química;
- Indústria farmacêutica;
- Energia.

A biotecnologia é interdisciplinar e por isso muitas aplicações são classificadas com mais de uma cor. Por exemplo, a produção de energia a partir de plantas ou de resíduos pode ser considerada biotecnologia branca ou verde. Portanto, a biotecnologia torna-se um instrumento poderoso, podendo substituir vasto número de processos industriais atualmente empregados e criando com isso novas e melhores soluções para uma grande gama de problemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2011. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª Edição. Editora Artmed.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Editora Artmed.

MADIGAN, Michael T.; MARTNKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Editora: Artmed. São Paulo. 2010.

Makron, 1997.

PELCZAR, CHAN, KRIEG. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª Ed. São Paulo:

ROBERTS, K.; WALTER, P. 2011. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª Edição. Editora

TRABULSI, ALTERTHUM. **Microbiologia**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.